

Aus der Klinik für Neurologie  
Abteilung für Experimentelle Neurologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zum makro- und  
mikroglialen Differenzierungspotential  
muriner Knochenmarkzellen  
in vitro und in vivo**

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Matthias Boentert

aus Dorsten

Dekane:

Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Josef Priller

2. PD Dr. rer. nat. Frank Kirchhoff

3. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Faissner

Datum der Promotion: 19. Juli 2004

## Abstract

Die vorliegende Arbeit untersucht das Differenzierungsverhalten adulter muriner Knochenmarkzellen im Zentralnervensystem *in vivo* und *in vitro*. Hierzu wurden letal bestrahlte Mäuse mit Knochenmark aus transgenen Mausmutanten transplantiert, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promoters exprimieren. Ein Teil der Rezipienten wurde vier Wochen nach Transplantation einer transienten fokalen cerebralen Ischämie unterzogen, um den Einfluss postischämischer inflammatorischer Vorgänge auf das Differenzierungsverhalten eingewanderter Zellen zu untersuchen. Eine zelluläre Koexpression von GFP und GFAP als Zeichen der Differenzierung hämatogener Zellen zu GFAP-exprimierenden Astrozyten fand sich bei keinem der analysierten Tiere. Für die *in vitro*-Versuche wurden murine Knochenmarkzellen auf Mausastrozyten und auf organotypischen entorhinal-hippocampalen Hirnschnitten kokultiviert. Die hierzu verwendeten Knochenmarkzellen waren entweder retroviral mit GFP transfiziert oder stammten aus zwei verschiedenen transgenen Mausmutanten, von denen eine GFP nahezu ubiquitär unter dem  $\beta$ -Actin-Promoter, die andere GFP unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promoters exprimiert. Während zahlreiche Knochenmarkzellen nach wenigen Tagen der Kokultur die morphologischen Charakteristika ruhender Mikroglia annahmen und Immunoreaktivität für den Makrophagen/Mikroglia-Marker Iba1 aufwiesen, fand sich keine einzige Zelle mit Koexpression von GFP und GFAP. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass adulte murine Knochenmarkzellen bzw. ihre Abkömmlinge im zirkulierenden Blut nicht in GFAP-exprimierende Astrozyten differenzieren.

Astroglia

Mikroglia

Knochenmarktransplantation

Transdifferenzierung

grün fluoreszierendes Protein

## Abstract

It has been postulated that adult murine bone marrow cells have the potential to differentiate into cells of neuroectodermal origin. In order to examine whether bone marrow cells can adopt an astroglial fate, various *in vivo* and *in vitro* approaches were chosen. Lethally irradiated recipient mice were transplanted with bone marrow derived from transgenic mice which express the green fluorescent protein (GFP) under the control of the human GFAP promoter. Four weeks after transplantation, several animals underwent transient focal cerebral ischemia. Although postischemic inflammatory processes may eventually have a permissive effect on cell differentiation, not a single cells coexpressing GFAP and GFP was found in the brains of all recipients examined. For *in vitro* studies, murine bone marrow cells were co-cultured on astrocytic monolayers or organotypic entorhinal-hippocampal brain slices. Bone marrow cells were either labelled by retroviral transfection with GFP or derived from two different transgenic mouse mutants expressing GFP under the control of the human GFAP-promoter or the murine  $\beta$ -Actin-promoter, respectively. After several days of co-culture bone marrow derived cells developed a ramified morphology and showed immunoreactivity for the monocytic/microglial marker Iba1. However, differentiation of bone marrow derived cells into GFAP-expressing astrocytes was not observed. Our results suggest that adult murine bone marrow cells cannot differentiate into GFAP-expressing astrocytes *in vivo* or *in vitro*.

astroglia

microglia

bone marrow transplantation

transdifferentiation

green fluorescent protein

## 1 Zusammenfassung

Das Differenzierungspotential adulter Knochenmarkzellen ist seit Jahren Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten. Entgegen der früheren Sichtweise, der zufolge adulte Stammzellen in ihrem Differenzierungspotential auf das Spektrum organ- oder gewebespezifischer Zellen beschränkt sind, liegen neuerdings zahlreiche Hinweise dafür vor, dass dieses Potential weitaus größer sein könnte. Angesichts der zumindest theoretischen Perspektive gentherapeutischer Behandlungsansätze bei z. B. neurodegenerativen Erkrankungen sind insbesondere diejenigen Befunde von Interesse, die zum neuronalen oder glialen Differenzierungspotential adulter Knochenmarkzellen veröffentlicht worden sind. Vorwiegend mittels tierexperimenteller *in vivo*- und *in vitro*-Ansätze wurde u. a. der Frage nachgegangen, ob adulte Knochenmarkzellen unter entsprechend permissiven Bedingungen Astrozyten differenzieren können, die das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) exprimieren. Die hierzu vorliegende Evidenz wurde in Zellkultur, nach Knochenmarktransplantation oder nach intrastriataler Injektion von Knochenmarkzellen gewonnen und ergibt ein widersprüchliches Bild. Für den *in vivo*-Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung von Knochenmark aus transgenen Mäusen, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promoters exprimieren, das Potential hämatogener Zellen untersucht, nach Knochenmarktransplantation letal bestrahlter Mäuse ins Gehirn der Empfängertiere einzuwandern und dort zu GFAP-exprimierenden Astrozyten zu differenzieren. Ein Teil der Rezipienten wurde vier Wochen nach Transplantation einer transienten fokalen cerebralen Ischämie unterzogen, da ein permissiver Effekt postischämisch ablaufender inflammatorischer Vorgänge auf das Differenzierungsverhalten eingewanderter Zellen beschrieben worden ist. Nach Transplantation der Empfänger-tiere mit transgenem Knochenmark wurde mittels PCR die erfolgreiche Rekonstitution des hämatopoetischen Systems durch Donor-

zellabkömmlinge dokumentiert. Den Nachweis der Fähigkeit dieser Zellen, aus dem zirkulierenden Blut ins adulte Zentralnervensystem (ZNS) einzuwandern, erbrachte die zusätzliche Markierung des transplantierten Knochenmarks durch retrovirale Transfektion mit GFP. Bei der mikroskopischen Analyse von Hirnschnitten der ausschließlich transplantierten Chimären fanden sich keine Zellen mit detektierbarer Expression von GFP bzw. Kolo-kalisation von GFP- und GFAP-Signal. Auch nach transi-er fokaler cerebraler Ischämie waren weder in der ischämischen noch in der kontralateralen Hemisphäre GFP-exprimierende Zellen nachweisbar. Zur Untersuchung eines möglicherweise permissiven Effekts unterschiedlicher Zellkulturbedingungen auf die makrogliale Differenzierung von Knochenmarkzellen wurden murine Knochenmarkzellen auf Mausastrozyten und auf organotypischen Hirnschnitten kokultiviert. Die hierzu verwendeten Knochenmarkzellen waren entweder aus Wildtyp-tieren entnommen und retroviral mit GFP transfiziert oder stammten aus zwei verschiedenen transgenen Mausmutanten, von denen eine GFP nahezu ubiquitär unter dem  $\beta$ -Actin-Promoter, die andere GFP unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promoters exprimiert. Zur Simulation möglichst physiologischer *in vitro*-Bedingungen wurden den Kokulturen keinerlei Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren zugesetzt. In der Kokultur GFP-markierter Knochenmarkzellen (transfiziert oder transgen) auf Astrozyten bzw. auf organotypischen hippocampalen Gewebeschnitten wurde bis zum 18. bzw. 8. Tag keine zelluläre Kolo-kalisation von GFP und GFAP detektiert. Bereits nach 5 Tagen der Kokultur fanden sich hingegen zahlreiche ramifizierte Zellen mit der Morphologie ruhender Mikroglia, die GFP und den Makrophagen-Marker Iba-1 exprimierten. Die Kokultur von Knochenmarkzellen aus GFAP/GFP-transgenen Donortieren erbrachte im gleichen Zeitraum keinen Hinweis auf eine makrogliale Differenzierung der Knochenmarkzellen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass adulte murine Knochenmarkzellen bzw. hämatogene Zellen weder im ZNS der adulten Maus noch *in vitro* zu GFAP-exprimierenden Astrozyten zu differenzieren in der Lage sind.



## 2 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden die Methoden und Ergebnisse experimenteller Untersuchungen zum Differenzierungspotential von Zellen aus dem Knochenmark bzw. dem Blut der adulten Maus vorgestellt. Im Rahmen der zwischen Mai 1999 und April 2000 durchgeführten Versuche wurde speziell der Frage nachgegangen, ob Zellen des hämatopoetischen Systems dazu in der Lage sind, unter geeigneten *in vitro*-Bedingungen sowie nach Knochenmarktransplantation *in vivo* zu GFAP-exprimierenden Astrozyten zu differenzieren, und *in vitro* die Fähigkeit besitzen, die morphologischen Charakteristika residenter ZNS-Mikroglia zu entwickeln. Um einen Beitrag zur Beantwortung dieser Fragen leisten zu können, wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt, die auf der genetischen Markierung von Knochenmarkzellen und konsekutiv ihren Abkömmlingen (Leukozyten) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) beruhten. Die *in vivo*-Experimente bedienten sich des Modells der heterologen Knochenmarktransplantation der Maus mit GFP-markiertem Donorknochenmark. Die oben formulierte Frage nach dem Differenzierungspotential der transfizierten Zellen bezieht sich hier demnach auf zirkulierende Knochenmarkabkömmlinge, deren Schicksal nach Einwanderung ins Zentralnervensystem es zu untersuchen galt. Die *in vitro* Versuche hingegen wurden mit GFP-markiertem Knochenmark (whole bone marrow) durchgeführt, das neben hämatopoetischen Zellen auch Elemente anderer Zellreihen enthält. Aussagen über das Differenzierungsverhalten dieser Zellen müssen diesem Umstand Rechnung tragen. Im folgenden Abschnitt der Einleitung soll zuerst auf Eigenschaften und Verwendbarkeit von GFP näher eingegangen werden. Nachfolgend wird, soweit erforderlich, der gegenwärtige Erkenntnisstand über Morphologie und Funktion der von den genannten Fragestellungen berührten Zelltypen dargestellt: Astrozyten und Mikroglia (Abschnitte 2.2 und 2.3). Durch Transplantations- und Zellkultur-Experimente hat in jüngster Zeit die Hypothese neue Unterstützung erfahren, dass Zellen des adulten hämatopoeti-

schen Systems ein Differenzierungspotential besitzen, welches u. a. die Differenzierung in Zelltypen des ZNS einschließt (Abschnitt 2.4). Abschließend werden die zellulären pathophysiologischen Vorgänge nach transienter fokaler cerebraler Ischämie skizziert und in ihrer möglichen Bedeutung für das Differenzierungspotential einwandernder hämatogener Zellen dargestellt (Abschnitte 2.5 und 2.6).

## **2.1 GFP als biologischer Zellmarker**

GFP (*green fluorescent protein*) ist ein fluoreszierendes Proteinmolekül, das in Zoelenteraten wie z. B. der pazifischen Qualle (*Aequoria victoria*) vorkommt und dort auch kloniert wurde (Tsien 1998). Es wurde in den sechziger Jahren entdeckt (Shimomura 1962) und als akzessorisches Protein zu einem weiteren chemilumineszenten Protein, Aequorin, beschrieben. GFP vermittelt in der pazifischen Qualle die Konversion des von Aequorin emittierten blauen Lichtes in die für das Tier typische Grünfluoreszenz. Die biologische Bedeutung dieses Energietransfers (*emission shift*) ist noch ungeklärt. Das natürlich vorkommende GFP besteht aus 238 Aminosäuren und enthält einen chromophoren Imidazolring (aus Ser-Tyr-Gly), dessen Exzitationsspektrum bei 395 nm einen ausgeprägten und bei 475 nm einen kleineren Gipfel aufweist. Der Peak des Emissionsspektrums liegt bei 508 nm. GFP ist ein Dimer. Die Struktur eines jeden Monomers besteht in einem zylindrisch angeordneten  $\beta$ -Faltblatt, in dessen Inneren eine axial verlaufende Alpha-Helix die Chromophore trägt. Seit 1992 besteht die Möglichkeit der klonalen Expression des GFP-Gens in *E. coli* (Prasher 1992), wodurch gezeigt werden konnte, dass es auch diejenige Information enthält, welche für die erst posttranslational erfolgende Synthese des chromophoren Zentrums erforderlich ist. Das natürlich vorkommende GFP aus *Aequoria* weist einige physikochemische Eigenschaften auf, die für seine Verwendung im medizinisch-biologischen Bereich von Nachteil sind: Die Proteinfaltung wird bei Temperaturen über 20 °C

zunehmend gestört; sodann neigt das Protein bei höheren Konzentrationen zur Aggregation, und der bei 395 nm liegende Hauptexzitationsgipfel macht die Verwendung von ultravioletterem Licht erforderlich, was negative Auswirkungen sowohl auf das Auge des Untersuchers als auch auf die mit GFP markierte Gewebeprobe selbst haben kann. Aus diesen Gründen wurden mehrere, meist durch Punktmutationen konstruierte Proteinvarianten entwickelt, bei deren Verwendung die genannten Probleme nicht oder zumindest weniger zum Tragen kommen. Innerhalb dieser Gruppe von Mutanten zeichnet sich besonders EGFP (E = *enhanced*) durch deutlich verbesserte Fluoreszenzeigenschaften aus. Zwei Punktmutationen, die den Ersatz von Ser65 durch Threonin (S65T) und von Phe64 durch Leucin (F64L) zur Folge haben, bedingen sowohl ein mehrfach verstärktes Fluoreszenzsignal bei 37 °C als auch die Akzentuierung des zweiten Exzitationsmaximums, das zudem von 475 nm hin zu etwa 489 nm verschoben ist (Patterson 1997). Der Emissionsgipfel von EGFP liegt bei 508 nm und ermöglicht die einfache Detektion markierter Zellen. Aufgrund der Möglichkeit, GFP/EGFP als funktionelles Transgen in Säugerzellen zu exprimieren (Chalfie 1994), hat das Protein überragende Bedeutung für die Markierung von Zellen, besonders aber als Marker für den Transfer anderer Gene erlangt. GFP ist intrazellulär im Cytoplasma und im Nucleus lokalisiert, was die homogene Markierung des gesamten Zelleibes zur Folge hat und besonders auch Aussagen über die Cytomorphologie erlaubt. Nucleolus und vesikuläre Zellorganellen bleiben im Rahmen der GFP-Expression ausgespart. GFP ermöglicht die direkte fluoreszenzmikroskopische oder durchflusszytometrische Detektion von Zellen in Echtzeit, so dass andere Kennzeichnungsverfahren mit immunhistochemischer Visualisierung des Markerantigens nicht erforderlich sind. Darüber hinaus bietet GFP - nach erfolgter Proteinfaltung - den Vorteil einer relativ großen Stabilität gegenüber physikalischen und chemischen Noxen, da die dreidimensionale Struktur des Moleküls den nah dem geometrischen Zentrum gelegenen Imidazolring (s. o.) eng umhüllt und z. B. vor Sauerstoffradikalen schützt. Zahlreiche und regelmäßig angeordnete Wasserstoffbrückenbindungen bedingen eine weitgehende Thermo-

stabilität der Sekundär- und Tertiärstrukturen. Diese physikochemischen Eigenschaften erklären die lange Lebensdauer des GFP-Signals *in vivo* und *in vitro* (Yang 1996).

## **2.2 Astrozyten und das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP)**

Die nicht-neuronalen Zellelemente des Zentralnervensystems von Säugetieren werden als Neuroglia bezeichnet. Der Begriff „Glia“ wurde von Rudolf Virchow geprägt und bedeutet in Anlehnung an das griechische Adjektiv γλισχρος (= klebrig, zäh) „Leim“ oder „Kitt“, was dem dichten und faserigen Charakter des interneuronalen Gewebes Rechnung trägt. Astrozyten bilden zusammen mit Oligodendrozyten die Gruppe der makroglialen Zellen in Gehirn und Rückenmark. Zur Neuroglia des ZNS werden außerdem Mikrogliazellen sowie im weiteren Sinn Ependymozyten, Pituizyten, retinale Müller-Zellen und die Bergmann'schen Zellen im Kleinhirncortex gezählt (Zenker 1994). Im intakten Gewebeverband sind reife Astrozyten sternförmig und besitzen einen großen, runden und zentral gelegenen Nucleus. Vom Zellkörper gehen nach allen Richtungen unterschiedlich lange Cytoplasmafortsätze aus. Entsprechend der Morphologie dieser Fortsätze werden fibrilläre und protoplasmatische Astrozyten unterschieden, wobei in Abhängigkeit von Lokalisation und Funktionszustand fließende Übergänge zwischen beiden Formen anzunehmen sind. Fibrilläre Astrozyten sind reich an cytoplasmatischen Intermediärfilamenten; sie weisen dünne, unverzweigte Fortsätze auf und sind schwerpunktmäßig in der weißen Substanz lokalisiert, wo sie mit den Enden ihrer Pseudopodien in Wechselwirkung mit den im Marklager verlaufenden neuronalen Fasern treten. Protoplasmatische Astrozyten besitzen meist kürzere Fortsätze mit größerem Kaliber, die in variablem Ausmaß verzweigt sein können. Diese Zellen finden sich vorwiegend in der grauen Substanz des ZNS, d. h. in enger Nachbarschaft zu Nervenzellen in den kortikalen und subkortikalen Kerngebieten. An der Oberfläche von Gehirn und Rückenmark bilden astrozytäre Endfüßchen die *Membrana limitans gliae superficialis*.

lis, die nur durch eine Basalmembran von der *Pia mater* getrennt ist und sich entlang der penetrierenden Blutgefäße als *Membrana limitans gliae perivascularis* in die Tiefe des Gewebes hinein forsetzt (Zenker 1994). Astrozyten wird eine zentrale Bedeutung für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Gewebestruktur des ZNS zugeschrieben. Aufgrund ihrer Fähigkeit, direkten Kontakt mit den übrigen Zellelementen einzugehen, tragen sie in anatomisch-mechanischer wie in physiologisch-funktioneller Hinsicht wesentlich zum Netzwerk aus Nerven- und Gliazellen bei. Astrozyten spielen eine wichtige Rolle für die lokale Ionenhomöostase im ZNS. Mit ihren zahlreichen Fortsätzen lagern sie sich an neuronale Perikarya, Axone und Synapsen an und sind über verschiedene Transportmechanismen in der Lage, Kaliumionen aus dem Extrazellulärraum aufzunehmen, die dort im Gefolge ständiger neuronaler Depolarisationsvorgänge akkumulieren. Eine weitere regulative Funktion erfüllen Astrozyten, indem sie Aminosäuren und (Ko-)Transmitter, die aus synaptischen Verbindungen herausdiffundieren, wieder aus dem Mikromilieu eliminieren. Zugleich synthetisieren sie selbst Botenstoffe und Rezeptormoleküle, um aktiv an der elektrochemischen Signalvermittlung teilzunehmen: Parallel zur Aktivität benachbarter Synapsen können calciumabhängige Signalkaskaden in Astrozyten detektiert werden, die zur Freisetzung von z. B. Glutamat führen und auf diesem Wege wiederum den intrazellulären Calciumgehalt der synaptischen Strukturen modifizieren (Vesce 1999, Carmignoto 2000). Die Endfüßchen von Astrozytenfortsätzen umhüllen kleine und kleinste Blutgefäße im Gehirn (s. o.), von deren Endothel sie nur durch eine Basallamina getrennt sind. Die räumliche Nähe dieser Strukturen erleichtert es den Astrozyten, Nährstoffe aus dem Blut aufzunehmen und an die benachbarten Nervenzellen weiterzuleiten (del Zoppo 2000), so dass sie zumindest im perivaskulären Bereich auch eine nutritive Funktion für Neuronen erfüllen. Astrozyten sind prinzipiell proliferationsfähig und in der Lage, mit ihrem biosynthetischen Apparat auf Umgebungsreize zu reagieren. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Astrozyten sowohl Antigene präsentieren als auch proinflammatorische Cytokine freisetzen können (Aschner 1998, Ridet 1997),

wird ihnen eine wichtige Funktion für die Immunabwehr des ZNS zugeschrieben. Damit spielen sie eine große Rolle nicht nur bei infektiösen und autoimmunen, sondern auch im Rahmen traumatischer und ischämischer Prozesse im Zentralnervensystem. Die zelluläre Reaktion von Astrozyten nach fokaler cerebraler Ischämie soll in Abschnitt 2.6. ausführlich besprochen werden. GFAP bildet das wesentliche Intermediärfilament in reifen Astrozyten des zentralen Nervensystems von Säugetieren. Es ist ein komplex strukturiertes Polypeptid aus 430 (Nager) oder 432 (Mensch) Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von ca. 49 kD und gehört zur Gruppe der Zytoskelettproteine. GFAP wurde 1969 entdeckt (Eng 1970) und hat als immunhistochemischer Marker für Astrozyten und gliale Hirntumoren in den letzten Jahrzehnten weitreichende Bedeutung erlangt, da einerseits das Molekül hochspezifische antigene Epitope aufweist und andererseits GFAP-enhaltende Astrozyten in den verschiedensten Hirnarealen lokalisiert sind. Allerdings wird das Protein nicht spezifisch von ZNS-Astrozyten exprimiert (Eng 2000); Immunoreaktivität für GFAP findet sich – wenn z. T. auch schwächer ausgeprägt – in unreifen Oligodendrozyten, nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen (Barber 1982, Jessen 1985), retinalen Müller-Zellen (Björklund 1985), Kupffer-Stern-Zellen der Leber (Gard 1985), gliaähnlichen Zellen des *Plexus myentericus* Auerbach, Zellen der Zirbeldrüse sowie in Zellen verschiedener nicht-glialer Tumoren (Hypophysenadenome, Nierenzellkarzinom, Meningeom). Innerhalb des ZNS adulter Organismen variieren Expression von und Gehalt an GFAP zwischen Astrozyten verschiedenen Typs und unterschiedlicher Lokalisation (Kalman 1989, McLendon 1994): So exprimieren in der grauen Substanz vorwiegend die protoplasmatischen Astrozyten GFAP, während dies im *Album* fast ausschließlich bei fibrillären Astrozyten der Fall ist. Bestimmte Areale weisen besonders starke Immunoreaktivität für GFAP auf, z. B. die Bergmann-Glia der Kleinhirnrinde, die subependymal gelegenen Astrozyten sowie die aus astrozytären Zellfortsätzen gebildete *Membrana limitans glia superficialis* an der Hirnoberfläche. Die Intensität des GFAP-Signals in Astrozyten ist nicht proportional mit dem GFAP-Gehalt der Zellen korreliert; viel-

mehr kann die Verstärkung der Immunoreaktivität z. B. bei pathologischen Prozessen unter anderem auf einer Dissoziation der Intermediärfilamente beruhen, durch die eine größere Anzahl von Epitopen freigelegt wird (McLendon 1994). Bereits an dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die immunhistochemische GFAP-Färbung am Gewebepräparat – anders als *in vitro* – nur eine eingeschränkte Sensitivität besitzt, so dass aus methodischen Gründen immer von der Existenz GFAP-negativer Astrozyten ausgegangen werden sollte (McLendon 1994, Korr 1994). Sowohl beim Menschen als auch bei Nagern lässt sich nachweisen, dass die GFAP-Expression in Astrozyten im Laufe des Lebens langsam zunimmt (Nichols 1993). Die gegenwärtigen Erkenntnisse über die Funktion von GFAP sind vor allem mit Hilfe verschiedener Modelle gewonnen worden, die auf der funktionellen Ausschaltung dieses Intermediärfilaments beruhen (GFAP-*Knockout*-Mäuse sowie *antisense*-Studien mit Blockierung der GFAP-Synthese/Translation durch gegensinnige RNA-Oligonukleotide). Demnach hat GFAP wesentlichen Anteil an der Formation eines intakten Zytoskeletts, insbesondere der Ausbildung und Stabilisierung von Zellfortsätzen (Weinstein 1991), die wiederum eine zentrale Rolle für Zell-Zell-Interaktion und Blut-Hirn-Schranke spielen. Astrozyten GFAP-defizienter Mäuse (*Knockouts*) weisen hinsichtlich dieser Funktionen schwere Störungen auf. Elektrophysiologische Untersuchungen an Hippocampusneuronen solcher Tiere zeigten veränderte elektrische Eigenschaften der Nervenzellmembranen, so dass ein Zusammenhang zwischen der funktionellen Integrität astrozytärer Zellfortsätze und der synaptischen Erregungsübertragung angenommen wird (McCall 1996, Vesce 1999). Die massiv gesteigerte Synthese von GFAP in Astrozyten ist ein hervorstechendes Kennzeichen der reaktiven Astroglie. Diese zelluläre Reaktion tritt unspezifisch im Gefolge praktisch jeder Gewebeschädigung im ZNS auf und führt mittelfristig zur Entstehung einer gliösen Narbe im Läsionsgebiet (s. Abschnitt 2.6). Neben die Bedeutung des GFAP in der Immunhistochemie ist seit 1985 eine Vielzahl von experimentellen Möglichkeiten getreten, die sich durch die Klonierung des für GFAP kodierenden Gens ergeben haben (Lewis 1984). Das GFAP-Gen liegt bei Men-

schen und Nagern in einer einzigen Kopie vor und ist auf Chromosom 17q21 (human) bzw. 11 (murin) lokalisiert (Bongcam-Rudloff 1991, Bernier 1988). Die Gen- und Promotersequenzen weisen bei Mensch, Maus und Ratte weitgehende Homologien auf (z. B. Mensch-Maus 87%); eine entsprechend große Übereinstimmung findet sich unter den drei Spezies in bezug auf mRNA und Proteinsequenz (vgl. Brenner 1994). Die Regulation der Transskription erfolgt durch einen basalen Promoter, der eine TATA-Box enthält und 29 bp oberhalb der Initiationsstelle liegt, im Falle des GFAP-Gens aber die besondere Eigenschaft besitzt, durch Synergismus mit einem weiter unterhalb davon lokalisierten Element eine deutlich verstärkte Transskription in Gang zu setzen. Die Kenntnis der relevanten Gen- und Promotersequenzen erlaubt den gezielten Transfer von Reportergenen in murine Oozyten, so dass verschiedene transgene Mausmodelle entwickelt worden sind, in denen das jeweilige Transgen unter der Kontrolle des basalen GFAP-Promoters spezifisch in Astrozyten exprimiert wird (Mucke 1993, Brenner und Messing 1996, Zhuo 1997, Nolte 2001).

## **2.3 Mikroglia**

Die Bezeichnung „Mikroglia“ wird zumeist für Zellen des Zentralnervensystems verwendet, die parenchymatös gelegen sind und im gesunden Gewebe einen länglichen Zellkörper besitzen, von dem mehrere dünne Zellfortsätze ausgehen. Diese teilen sich wiederum in kleinere Verzweigungen auf. Der Nucleus ist klein, ebenfalls länglich-oval und wird von einem Zytoplasmasaum umgeben. Mikrogliazellen mit dieser Morphologie werden auch als resident bzw. ramifiziert bezeichnet; sie kommen bei Säugetieren in allen Regionen des Zentralnervensystems vor. Erstmals wurden sie 1932 von Astrozyten und Oligodendrozyten abgegrenzt (del Rio Hortega 1932). Einige Autoren weiten den Begriff der Mikroglia auf eine Zellpopulation aus, die perivaskulär lokalisiert ist und sich morphologisch von parenchymatösen Mikrogliazellen unterscheidet (Be-



cher 2000). Perivaskuläre Zellen sind nicht mit Perizyten zu verwechseln und sind vom Hirnparenchym durch eine Basalmembran getrennt. Im folgenden soll der Mikrogliebegriff in seiner engeren Bedeutung Anwendung finden und sich nur auf parenchymatöse Zellen beziehen. Mikrogliazellen weisen phänotypisch sowie funktionell einige Gemeinsamkeiten mit Blutmonozyten und Gewebemakrophagen auf. Zum einen exprimieren sie bereits im nicht aktivierten Zustand Antigene, die ansonsten nur auf hämatogenen Zellen zu finden sind, so z. B. CD45, CD11b oder CD64 (vgl. Ulvestad 1994)<sup>1</sup>. Zum anderen sind sie nach adäquater Stimulation durch Erregerantigene, endogene Proteinprodukte oder untergegangene Zellen dazu in der Lage, zahlreiche Chemokine freizusetzen, phagozytotisch aktiv zu werden und Oberflächenmoleküle zu exprimieren, die ebenfalls für aktivierte Makrophagen charakteristisch sind. Beim Übergang von der ramifizierten zur reaktiven Form nehmen die Zellen zudem eine runde Morphologie an. Aufgrund der Expression des MHC-II-Moleküls können (humane) Mikrogliazellen zu den Antigenpräsentierenden Zellen innerhalb des ZNS gerechnet werden (Becher 2000). Mit diesen Eigenschaften stellt die Mikroglia eine wichtige Grundlage für die Entstehung sowohl einer unspezifischen als auch einer spezifischen Immunantwort in Gehirn und Rückenmark dar. Der histologische Ursprung von Mikrogliazellen ist bis heute nicht abschließend geklärt. In der Literatur findet sich überwiegend die Ansicht, dass sie im Gegensatz zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten mesodermaler Herkunft sind. Hierfür sprechen einerseits die Gemeinsamkeiten mit Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS), die sich sowohl auf die Funktion als auch auf die Antigenexpression beziehen. Diese gehen so weit, dass Mikrogliazellen seit ihrer Erstbeschreibung als residente Makrophagen des ZNS betrachtet werden (del Rio Hortega 1932, Banati 1991), die wie z. B. Kupffer-Stern-Zellen in der Leber einen gewebespezifischen Phänotyp ausprägen. Zudem konnte gezeigt werden, dass bis in die frühe Postnatalzeit hinein Monozy-

---

<sup>1</sup> Expression von CD45 (*common leukocyte antigen*, OX1) kennzeichnet alle kernhaltigen reifen Blutbestandteile, CD11b (OX42) wird von allen Zellen der myelomonozytären Reihe einschließlich der Mikroglia exprimiert.

ten-ähnliche Zellen aus dem Blut ins ZNS einwandern und sich dort zu amöboiden, später ramifizierten bzw. residenten Mikrogliazellen differenzieren (Ling 1979, Perry 1988). Demgegenüber stützt sich die Hypothese eines neuroektodermalen Ursprungs der Mikroglia auf Arbeiten, die die Entstehung zumindest Mikroglia-ähnlicher Zellen aus neuroepithelialen bzw. astrozytären Kulturen dokumentierten, in denen myelomonozytäre Antigene ursprünglich nicht präsent waren (Hao 1991, Richardson 1993). Im adulten Gehirn sind Mikrogliazellen prinzipiell teilungsfähig; sie weisen eine enorm lange Lebenszeit sowie eine niedrige Umschlagsrate (*turnover*) auf. Die Aufrechterhaltung einer konstanten Population wird zum einen durch lokale Proliferation gewährleistet (Alliott 1991, Lawson 1992). Zum anderen sind in den letzten Jahren Erkenntnisse darüber gewonnen worden, dass sich Mikrogliazellen im adulten ZNS auch unter physiologischen Bedingungen weiterhin aus dem Blut rekrutieren, was die Annahme ihrer hämatogenen Herkunft zusätzlich unterstützt. In Transplantationsexperimenten mit genetisch markiertem Knochenmark konnte an adulten Nagern auch in eigenen Studien gezeigt werden, dass sich hämatogene Zellen an der ständigen Erneuerung perivaskulärer Zellen beteiligen (Hickey 1988, Lassmann 1993, Kennedy 1997, Bechmann et al. 2001), aber auch weiter ins Parenchym einwandern (de Groot 1992, Eglitis 1997, Kennedy 1998, Ono 1999, Brazelton 2000, Priller et al. 2001), dort mikroglial-monozytäre Marker exprimieren (de Groot 1992, Eglitis 1997, Brazelton 2000, Priller et al. 2001) und ramifizieren (de Groot 1992, Priller et al. 2001). Demgegenüber fanden sich in *post-mortem* Untersuchungen an Gehirnen von Patienten, die eine geschlechtsdifferente Knochenmarktransplantation erhalten hatten, zwar Donorzellabkömmlinge im Parenchym und im perivaskulären Raum, ramifizierte Zellmorphologien wurden jedoch nicht beobachtet (Unger 1993). Auch wenn diese *in vivo*-Experimente größtenteils nur den hämatogenen, nicht aber den eindeutig monozytären Ursprung einer Mikroglia-Subpopulation nahelegen, spricht doch einiges dafür, dass es reife Monozyten sind, die ins ZNS einwandern und sich dort entsprechend differenzieren. Lawson et al. zeigten *in vivo* durch Tritium-Thymidin-Markierung

proliferierender Zellen, dass der *Turnover* F4/80-positiver Mikroglia zu etwa 45-53% durch die Einwanderung von monozytären Vorläufern zustande kommt, die ebenfalls F4/80 exprimieren (Lawson 1992, Kennedy und Abkowitz 1998). Ferner lassen sich Blutmonozyten, Milz-makrophagen und Mikrogliazellen, die separat auf Astrozyten kultiviert werden, morphologisch, immunhistochemisch und elektrophysiologisch nicht voneinander unterscheiden; alle drei Zelltypen nehmen in der Kokultur die ramifizierte Morphologie residenter Mikrogliazellen an (Sievers 1994a, Sievers 1994b, Schmidtmayer 1994, Wilms 1997).

## **2.4 Differenzierungspotential von Stammzellen aus dem Knochenmark**

### **2.4.1 Differentielle Flexibilität von Stammzellen**

Nach traditionellem Verständnis sind multipotente oder adulte Stammzellen in ihrem Differenzierungspotential auf das Spektrum der in „ihrem“ jeweiligen Organ oder Gewebe vorkommenden Zellen beschränkt. Diese Sichtweise impliziert, dass organspezifische Stammzellen sich gemäß eines früh determinierten genetischen Programms entwickeln, welches ausschließlich in diesem einen Organ bzw. Gewebe zum Tragen kommt und durch zelluläre Umgebungsbedingungen oder andere Einflüsse nicht mehr umzukehren ist. Hierfür sprechen zahlreiche Befunde, so z. B. die Beobachtung, dass sich undifferenzierte embryonale Gewebeanteile nach ihrer Verpflanzung in andere anatomische Regionen des Embryos entsprechend ihres Herkunftsortes weiterentwickeln und nicht ihrer neuen Umgebung „entgegendifferenzieren“ (Anderson 2001). Ein analoges Phänomen findet sich im klinischen Vorkommen versprengter Gewebeanteile in verschiedenen Organen (z. B. Struma ovarii) oder auch bei embryonalen Tumoren. Dieses Konzept ist durch neuere Forschungsergebnisse in Frage gestellt worden. Es wurden Arbeiten vorgelegt, die erste Hinweise dafür liefern, dass die Flexibilität bzw. Plastizität adulter Stammzellen in be-

zug auf den Phänotyp ihrer Abkömmlinge weitaus größer sein könnte als bisher angenommen (Lemischka 1999, Morrison 2000). Hierbei handelt es sich sowohl um *in vitro*-Studien als auch um tierexperimentelle Arbeiten, von denen letztere zumeist auf Transplantationsversuchen basierten (systemische Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation oder direkte intraparenchymatöse Injektion/Infusion von Zellen). Als Kriterien einer erfolgten „Transdifferenzierung“ dienen vorwiegend die Zellmorphologie sowie die Expression zell- oder linienspezifischer Antigene. Unter den *in vivo*-Arbeiten weisen z. B. einige auf eine wechselseitige Plastizität von Stammzellen aus Knochenmark und Skelettmuskulatur hin. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass Donor-Knochenmarkzellen sich in die Skelettmuskulatur der Empfängertiere integrierten (Gussoni 1999, Ferrari 1998). Andererseits konnte die Fähigkeit von Myozyten zur Repopulation des hämatopoetischen Systems dokumentiert werden (Jackson 1999). Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, dass die Flexibilität von Stammzellen eine Differenzierung in Zelltypen einschließen könnte, die sich normalerweise von einem anderen Keimblatt herleiten als die Stammzelle selbst. So fanden sich nach Transplantation angereicherter hämatopoetischer Stammzellen in zahlreichen Organen bestrahlter Rezipienten Hinweise auf eine epitheliale Um-differenzierung hämatogener Zellen, so z. B. in Leber (Petersen 1999, Lagasse 2000), Ösophagus, Darm, Lunge und Haut (Krause 2001). Eine Reihe weiterer Experimente ergab Hinweise auf die Fähigkeit von Knochenmarkstammzellen bzw. ihren Abkömmlingen, einen neuronalen oder astrozytären Phänotyp anzunehmen (*in vivo*: Eglitis 1997, Eglitis 1999, Azizi 1998, Kopen 1999, Mezey 2000, Brazelton 2000, Chen 2000a, Chen 2000b, Li 2000, Li 2001, Priller et al. 2001; *in vitro*: Woodbury 2000, Sanchez-Ramos 2000). Im folgenden Abschnitt soll hierauf ausführlich eingegangen werden. Auch für die potentielle Umkehrbarkeit einer solchen „Transdifferenzierung“, von neuralen Stammzellen hin zu Zellen des hämatopoetischen Systems, liegen Hinweise vor (Bartlett 1982, Bjornson 1999). Die Fähigkeit neuraler Stammzellen, sich zu Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren, wurde anhand chimärer Embryonen (Maus, Hühn-

chen) dokumentiert (Clarke 2000). Diese Befunde werden allerdings teilweise von Morshead et al. relativiert und durch *in vitro* möglicherweise auftretende genetische oder epigenetische Veränderungen erklärt (Morshead 2002).

#### **2.4.2 Knochenmark als Quelle potentiell transdifferenzierender Stammzellen**

Im Hinblick auf zukünftige Therapieoptionen stellt Knochenmark eine vergleichsweise leicht zugängliche Quelle von Stammzellen dar. Es wird angenommen, dass adultes Knochenmark mindestens zwei Arten von multipotenten Stammzellen enthält, die beide mesenchymalen Ursprungs sind und jeweils zur Aufrechterhaltung unterschiedlicher Zellsysteme innerhalb des Knochenmarkorgans beitragen: hämatopoetische Stammzellen sowie stromale Stammzellen. Letztere repopulieren die Zellen des Knochenmarkstromas. Stromale Zellen (*marrow stromal cells/MSC*) stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die sich u. a. aus Fibroblasten, Retikulumzellen, dendritischen Zellen und Adipozyten zusammensetzt. In hämatopoetisch aktivem Knochenmark proliferieren diese Zellen nicht und erfüllen im Zusammenspiel mit den Zellen des blutbildenden Systems wichtige myelosupportive und immunologische Funktionen. Bei systemischer Infusion oder Injektion von Knochenmarkzellen in myeloablativ bestrahlte Empfängertiere muss davon ausgegangen werden, dass ein heterogenes Gemisch aus hämatopoetischen und stromalen Zellen einerseits sowie mehr und weniger differenzierten Zellen andererseits übertragen wird. Die Zuordnung von Knochenmarksabkömmlingen in den Organen der Chimären zu einer der beiden genannten Stammzellarten ist daher nicht ohne weiteres möglich, weshalb die möglichst weitgehende Aufreinigung und Spezifizierung der transplantierten Zellen ein wichtiges Postulat für Transplantationsexperimente darstellt<sup>2</sup>. Murine hämatopoetische Stammzellen

---

<sup>2</sup> Dabei ist in Betracht zu ziehen, dass stromale Donorzellen wegen der relativ hohen Strahlenresistenz des Knochenmarkstromas im Rezipienten nur eine geringe Repopulationschance haben (vgl. Polli 2000).

(HSC) kommen mit einer Häufigkeit von etwa 1 zu 100.000 Zellen im Knochenmark vor (Harrison 1990). Sie lassen sich mittels der Durchflusszytometrie prospektiv anreichern, indem aus dem entnommenen Knochenmarkgemisch Zellen mit den Phänotypen  $AA4^{+}Sca-1^{+}c-Kit^{+}Lin(KTSL)^{-/low}$  oder  $Sca-1^{+}c-Kit^{+}Thy1.1^{low} Lin(KTSL)^{-/low}$  isoliert werden<sup>3</sup>, wobei die Spezifität der Prozedur von der Anzahl der hinzugezogenen Antigene abhängt (Spangrude 1988, Cheshier 1999, Terskikh 2001). Eine hämatopoetische Ur-Stammzelle konnte bisher noch nicht eindeutig abgegrenzt werden (vgl. Gage 2000). Angereicherte HSC mit anhaltender Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen ein hohes und nachhaltiges Repopulationspotential, was sich daran zeigt, dass zur erfolgreichen Rekonstitution lethal bestrahlter Empfängertiere wenige Zellen – bis hin zu einer einzigen (Krause 2001) – ausreichen, während dazu bei Transplantation von Knochenmarkgemisch mehr als 100.000 Zellen erforderlich sind. Zahlreiche Transplantationsexperimente haben die Hypothese bestätigt, dass im adulten Organismus Zellen aus der Zirkulation die Blut-Hirn-Schranke passieren und ins Hirngewebe übertreten. Dieser Prozess findet auch unter quasi-physiologischen Bedingungen statt, d. h. ohne ein weiteres Schadensmodell, das über die mit der Transplantation verbundene Bestrahlung hinausgeht. Der am besten untersuchte und am häufigsten reproduzierte Befund besteht im Nachweis perivaskulärer Zellen und parenchymatöser Mikroglia, die anhand ihrer Markierung als von Donorzellen abstammend erkannt werden können. Im Abschnitt 2.3. wurde auf diesen Sachverhalt ausführlicher eingegangen. Die Differenzierung hämatopoetischer Zellen über die Keimblattbarriere hinweg wurde erstmals von Eglitis und Mezey (1997) beschrieben, die nach Transplantation stammzelldefizienter Mäuse mit retroviral markiertem oder gegengeschlechtlichem Knochenmark sowohl makroglial als auch mikroglial umdifferenzierte Donorzellen im Hirnparenchym fanden, wobei sich dieser Befund auf die Expression des mikroglial-monozytären Antigens F4/80 bzw. von GFAP stützt. In einem ähnlichen Modell mit Transplantation neugeborener Mäuse wurden im ~~Großhirn der Chimären~~ Donorzellabkömmlinge detektiert, die neuronale Antigene wie NeuN,

<sup>3</sup> Sca-1 = stem cell antigen 1, entspricht CD34 beim Menschen (Donnelly 2001).

Donorzellabkömmlinge detektiert, die neuronale Antigene wie NeuN, Neuronen-spezifische Enolase (NSE) und GFAP exprimierten (Mezey 2000a, Mezey 2000b). Mit Ausnahme des Nachweises einer Kolo-kalisation von GFAP und GFP konnte dieser Befund auch an adulten Mäusen bestätigt werden, die keinen hämatopoetischen Stammzelldefekt aufwiesen (Brazelton 2000). Stromale Knochenmarkzellen sind im Gegensatz zu den meisten Zellen der Hämatopoese in Kultur adhären-t, eine Eigenschaft, die in zahlreichen Protokollen für ihre Isolierung ausgenutzt wird (Friedenstein 1968, Azizi 1998, Colter 2001). Allerdings teilen sie dieses Verhalten mit Monozyten; von diesen können sie aufgrund der fehlenden Expression des monozytären Antigens CD11b separiert und auf diese Weise immunodepletiert werden (Kopen 1999). Weitere Methoden der Isolierung stromaler Knochenmarkzellen sind beschrieben worden, darunter die Dichtegradientenzentrifugation (Pittenger 2000, Sanchez-Ramos 2000) sowie die Immunodepletion auf Basis der negativen Immunoreaktivität für Sca-1 bei murinen Zellen (Sanchez-Ramos 2000). Aus adultem Knochenmark konnten multipotente stromale Stammzellen (auch: mesenchymale Stammzellen oder CFU-*fibroblastic*) isoliert werden (Friedenstein 1968), die unter den entsprechenden Zellkulturbedingungen die Fähigkeit besitzen, sich in Knorpel-, Knochen-, Fett-, Bindegewebs- oder Stromazellen zu differenzieren (Friedenstein 1968, Friedenstein 1974, Bianco 1988, Kopen 1999). Ausgereifte Stromazellen (Adipozyten, Chondrozyten oder Retikulumzellen) besitzen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* das Potential, sich ineinander umzuwandeln (Bianco 1988, Bennett 1991). Humane stromale Zellen erwiesen sich nach Injektion ins Striatum von Ratten als ähnlich migrationsfähig wie implantierte neurale Stammzellen und Astrozyten; zudem riefen sie keine lokale Immunantwort hervor und differenzierten sich nicht in mesenchymale Zellarten (Azizi 1998). Nach intraventrikulärer Infusion ins Gehirn neugeborener Mäuse fanden sich immunodepletierte stromale Stammzellen bzw. ihre Nachkommenschaft in allen Hirnregionen einschließlich neurogenetisch relevanter Areale; einige Zellen in Striatum und Hirnstamm zeigten darüber hinaus Immunoreaktivität für GFAP und gelegentlich auch Neurofilament (Kopen 1999).

Sca-1-negative Knochenmarkszellen exprimieren in Kultur auf fetalen Neuronen (Maus, Ratte) vereinzelt astrozytäre oder neuronale Marker (Sanchez-Ramos 2000). CD11b- und CD45-negative stromale Zellen nahmen in Kultur die Morphologie ausgereifter Neuronen an und exprimierten Antigene wie NSE, Tau, NeuN und trkA, nicht aber GFAP (Woodbury 2000). Zusammenfassend muss davon ausgegangen werden, dass die Fähigkeit stromaler Stammzellen, sich in Zellen neuroektodermalen Typs umzuwandeln, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* noch nicht abschließend geklärt ist. Bevor in Abschnitt 2.6. ausführlich auf die Frage eingegangen wird, inwieweit die fokale cerebrale Ischämie als Läsionsmodell zu neuen Erkenntnissen über das Differenzierungspotential von Stammzellen aus dem Knochenmark beitragen kann, sollen im folgenden die zellulären Reaktionen auf eine lokal begrenzte ischämische Schädigung des ZNS im Überblick dargestellt werden.

## **2.5 Zelluläre Reaktionen nach fokaler cerebraler Ischämie**

Es existieren verschiedene Tiermodelle zur Erforschung der Pathomechanismen, die im Rahmen einer cerebralen Ischämie in Gang gesetzt werden und das Ausmaß sowohl des strukturellen als auch des funktionellen Residualschadens bestimmen. Auch wenn diese Modelle die Bedingungen des ischämischen Schlaganfalls beim Menschen immer nur unvollständig abbilden, konnten weitreichende Erkenntnisse über die zellulären Abläufe gewonnen werden, die als Folge der Blutflussunterbrechung auftreten und mit entsprechender Vorsicht auch für die humane Situation angenommen werden können (Garcia 1984, McAuley 1995). Bei dem im tierexperimentellen Teil der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsmodellen handelt es sich um eine transiente bzw. permanente fokale cerebrale Ischämie, bei der mittels eines in die A. carotis interna eingeführten Fadens die Durchblutung des gesamten Medialstromgebietes vorübergehend bzw. dauerhaft unterbrochen wird (Hara 1997). In Abhängigkeit von der Ischämiedauer ergeben sich



Infarktareale verschiedener Größe. Aufgrund von regionalen Unterschieden hinsichtlich Durchblutung und Kollateralversorgung sind bei der fokalen Ischämie bestimmte Gewebeareale stärker und andere wiederum schwächer vom Perfusionsdefizit betroffen. Dort, wo die Durchblutungsstörung ausreichend lange anhält, wird die Schwelle der letalen Zellschädigung überschritten, und es kommt aufgrund eines akuten Substratmangels zum nekrotischen Untergang erst der Neuronen und später aller übrigen Zellen (Pannekrose). In diesem Bereich (*core* bzw. Infarktkern) beträgt die Blutflussreduktion mindestens 85%; nach MCAO erstreckt er sich auf die lateralen Basalganglien und den angrenzenden somatosensorischen Cortex (Lipton 1999). Daran angrenzend liegt eine Übergangszone (Penumbra), in der die Abnahme der Perfusion (auf  $< 40\%$ ) vorerst nur eine subletale, d. h. potentiell reversible Nervenzellschädigung nach sich zieht, während die übrigen Zelltypen kaum oder gar nicht in Mitleidenschaft gezogen werden (Hossmann 1995). Die fokale cerebrale Ischämie löst eine inflammatorische Reaktion aus, an der hämatogene, makro- und mikrogliale Zellen beteiligt sind. Besonders für die Penumbra wird ihr – zumindest teilweise - ein schädigender Effekt zugeschrieben, der noch lange nach Beginn der Reperfusion den progredienten Untergang funktionell wichtiger Gewebelemente unterhält und damit zur weiteren Ausbreitung des Infarktes beiträgt. Zahlreiche experimentelle Strategien zielen darauf, diese lokale Entzündungsreaktion pharmakologisch einzudämmen und klinisch verwendbare Kandidaten für eine neuroprotektive Therapie des cerebrovaskulären Insults auszumachen. Im Kontext der vorliegenden Arbeit von größerer Bedeutung sind Ansätze, die auf der systemischen oder intracerebralen Transplantation potentiell transdifferenzierender Zellen beruhen und auf diesem Wege die Regeneration des geschädigten Gewebes zu fördern versuchen.

### **2.5.1 Neuronen**

Unterschiedliche Nervenzellpopulationen differieren hinsichtlich ihrer Vulnerabilität gegenüber

einem ischämisch bedingten Substratmangel. Dieses Phänomen wird auch als Pathoklise bezeichnet und spiegelt die funktionelle bzw. metabolische Heterogenität von Nervenzellen unterschiedlicher Lokalisation wider. Wie andere Zellen auch, reagieren Neuronen auf eine letale Zellschädigung mit ihrem nekrotischen oder apoptotischen Untergang. Nekrose und Apoptose sind nach fokaler Ischämie gemeinsam auftretende Prozesse. Apoptotische Neuronen dominieren in Bereichen mit primär weniger gravierender Zellschädigung, sind also wesentlich zahlreicher in der Penumbra zu finden als in der *core*-Region. Unspezifische Auslöser des „programmierten Zelltodes“ sind u. a. NO, freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies, erhöhtes intracelluläres Calcium, verminderte mitochondriale Aktivität, Desintegration der Mikrotubuli und die Freisetzung von Cytochrom-c aus Mitochondrien (Lipton 1999). Eine zusätzliche Rolle spielen Cytokine und Neurotoxine, die im Rahmen der Aktivierung von Leukozyten und Gliazellen sezerniert werden (Linnik 1993, Li 1995, Braun 1996, Stoll 1998).

### **2.5.2 Leukozyten**

Die Einwanderung von Leukozyten ins Hirnparenchym nach fokaler cerebraler Ischämie ist als Diapedeseprozess beschrieben worden, der durch die enge Wechselwirkung von Endothelzellen und Leukozyten gekennzeichnet ist (Garcia 1994, Ritter 2000). Bei erhaltener Minimalperfusion wird er sowohl durch permanente als auch durch eine transiente Ischämie in Gang gesetzt; bei letzterer läuft er verstärkt erst nach Einsetzen der Reperfusion ab (Ritter 2000). Unter dem Einfluss sogenannter L-Selectine auf Leukozyten kommt es zum *rolling*, bei dem sich die Zellen an die Gefäßwand anlagern. Zytokine aus dem ischämisch und inflammatorisch geschädigten Endothel induzieren die leukozytäre Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle bzw. Integrine, welche die Verbindung zwischen Leukozyten und Endothel verstärken (*adhesion*). Durch Interzellularspalten zwischen den Endothelzellen treten die Leukozyten schließlich ins Parenchym

über (*migration*). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Einsetzen der Ischämie werden unterschiedliche Leukozytenpopulationen vorzugsweise rekrutiert. Auf diese Weise erhält die Beteiligung hämatogener Zellen an der lokalen Entzündungsreaktion ein zeitliches Muster: Am Anfang steht dabei die innerhalb der ersten 12 Stunden einsetzende Einwanderung vorwiegend neutrophiler Granulozyten in den Infarktkern (Clark 1993), an die sich nach 1 bis 3 Tagen eine von zahlreichen Monozyten/Makrophagen dominierte Abräumphase anschließt, in der allerdings hämatogene und mikrogliale Reaktion ineinandergreifen.

### **2.5.3 Mikroglia**

Mikrogliazellen sind sowohl an der spezifischen als auch an der unspezifischen Immunantwort im Zentralnervensystem beteiligt. Sie sind in der Lage, apoptotische oder geschädigte Zellen in ihrer unmittelbaren Umgebung zu erkennen und daraufhin eine inflammatorische Reaktion anzustoßen (Devitt 1998). Im aktivierten Zustand sind Mikrogliazellen zuerst durch den Verlust ihrer ramifizierten Morphologie und eine gesteigerte Proliferationstätigkeit gekennzeichnet (Streit 1988). Im weiteren Verlauf wird die Freisetzung von Chemokinen initiiert und graduell gesteigert, wobei sich das Ausmaß der Aktivierung im Spektrum der sezernierten Effektorstoffe widerspiegelt. Die überwiegend proinflammatorisch wirksamen Zytokine fördern die Permeabilisation der Blut-Hirn-Schranke sowie den weiteren Leukozyteneinstrom aus dem Blut; gleichzeitig kommt es zur Ausschüttung direkt zytotoxischer Substanzen wie TNF und reaktiver Sauerstoffspezies (vgl. Becher 2000). Schließlich werden Mikrogliazellen wie Makrophagen phagozytisch aktiv, können aber von diesen dann weder morphologisch noch immunhistochemisch eindeutig unterschieden werden, da sie zugleich weitgehend identische intrazelluläre und membranständige Marker exprimieren (Perry 1993, George 1994). Schroeter et al. (1997) konnten an Monozyten-depletierten Ratten zeigen, dass die phagozytäre Umwandlung residenter Mikroglia-

zellen der Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut um einige Tage vorausgeht, d. h. schon unmittelbar nach Beginn der Ischämie einsetzt. Nach Ergebnissen von Kato et al. kann davon ausgegangen werden, dass Mikrogliazellen innerhalb von Minuten aktiviert werden und damit die früheste nicht-neuronale Zellpopulation darstellen, die auf die Ischämie bzw. auf den Untergang benachbarter Neurone reagiert (Kato 1996). Noch nicht endgültig geklärt ist die Frage, zu welchen Anteilen Zellen beiderlei Herkunft am lokalen Geschehen beteiligt sind und inwieweit sie sich dabei funktionell unterscheiden.

#### **2.5.4 Astrozyten**

In der Penumbra reagieren subletal geschädigte Astrozyten primär unspezifisch mit zellulärer Hypertrophie, Proliferation und Steigerung ihrer biosynthetischen Aktivität (Smith 1997). In diesem Zustand werden sie als reaktive Astrozyten bezeichnet; mit Blick auf den gesamten Prozess spricht man von reaktiver (Astro-)Gliose. Der Übergang von der ruhenden zur aktivierten Zelle äußert sich u. a. in der massiv gesteigerten Synthese von unspezifischen Intermediärfilamenten wie GFAP, S100-beta und Vimentin (Boyes 1986, Vijayan 1990). Nach fokaler cerebraler Ischämie bildet sich rasch ein signalintensiver Astrozytenwall um das Infarktgebiet herum, während in der *core*-Region ab dem ersten bis zweiten Tag praktisch kein GFAP mehr nachweisbar ist (Chen 1993, Li 1995). Die Hochregulation von Zytoskelettproteinen in Astrozyten ist vom Alter des Organismus und von der räumlichen Distanz zum Läsionsort abhängig. Bei neugeborenen Nagern sind Ausdehnung und Intensität des GFAP-Signals deutlich geringer als bei adulten Tieren (Ridet 1997). Zu den unspezifischen Kennzeichen reaktiver Astrozyten gehört die mäßig erhöhte Expression von Rezeptoren für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF (Reilly 1996) und den Epidermalen Wachstumsfaktor EGF (Nieto-Sampredo 1988) als Ausdruck der gesteigerten Responsivität gegenüber der inflammatorisch veränderten Umgebung (Dorf 2000).

Einen direkten Einfluss auf das lokale Mikromilieu stellt die verstärkte Synthese und ggf. Sekretion von Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Enzymen und Adhäsionsmolekülen durch reaktive Astrozyten selbst dar. Hierzu gehören z. B. die vorwiegend proinflammatorisch wirkenden Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , Morganti-Kossmann 1992, Yu 2000), während TGF-beta (*transforming growth factor*), NGF (*nerve growth factor*), PDGF (*platelet derived growth factor*), IGF-I (*insuline-like growth factor*) und verschiedene FGF-Typen auf die weitere Astroglie und eventuell sogar auf die Regeneration beschädigter Axone Einfluss nehmen, neuroprotektiv wirken oder den Wiedereintritt von Neuronen in den Zellzyklus induzieren (Bressler 1985, Kniss 1988, Morrison 1988). Die Glianarbe als mechanische Barriere stellt ein Hindernis für axonales Wachstum dar, schottet allerdings zugleich das verletzte Areal vom umgebenden gesunden Gewebe ab, so dass dieses wiederum vor einer weiteren Ausbreitung des krankhaften Prozesses geschützt ist. Versuche mit astrozytär-neuronalen Mischkulturen haben gezeigt, dass Astrozyten unter dem Einfluss von IL-1 $\beta$  Neurotoxine freisetzen. Trotzdem konnte in den letzten Jahren Evidenz dafür gesammelt werden, dass eine reaktive Gliose als Teilprozess der komplexen inflammatorischen Reaktion unter bestimmten Umständen die neuronale Regeneration nicht nur fördert, sondern überhaupt erst möglich macht (Ridet 1997). Dafür spricht zum einen die gesteigerte Expression der oben genannten neurotrophen Faktoren durch reaktive Astrozyten; zum anderen werden von diesen Zellen auch verstärkt Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixproteine gebildet, deren permissiver Effekt auf das axonale Wachstum hinreichend dokumentiert werden konnte (Rutishauser 1996, Malhotra 1994, Aubert 1995, Chauvet 1996).

## 2.6 Cerebrale Ischämie und Zelldifferenzierung

Cramer und Chopp (2000) widmeten eine ausführliche Übersichtsarbeit der Fragestellung, inwieweit das Muster der funktionellen Erholung sowie die zellulären Reaktionen nach cerebraler Ischämie Parallelen zur normalen Entwicklung des Zentralnervensystems aufweisen. Anhand klinischer, funktionell-kernspintomographischer und tierexperimenteller Befunde werden zahlreiche Gemeinsamkeiten zwischen Regeneration und Ontogenese zusammengetragen und diskutiert. Für die vorliegende Arbeit von Interesse ist die Beobachtung, dass in ischämisch geschädigtem Hirngewebe Proteine wie z. B. Nestin exprimiert werden, die im adulten ZNS nicht oder kaum vorkommen und normalerweise eine Rolle im Rahmen der Entwicklung des Nervensystems spielen (Li 1999). Reaktive Astrozyten weisen also immunzytochemisch Gemeinsamkeiten mit unreifen fetalen oder adulten Astrozyten auf, indem sie embryonale Marker ausprägen (Rutishauser 1996, Aubert 1995, Li 1999). Es besteht Unklarheit darüber, inwieweit sie durch einen Dedifferenzierungsprozess reifer Astrozyten entstehen oder aus unreiferen Vorläuferzellen hervorgehen. Ohne eindeutige zelluläre Zuordnung konnten vor allem in der Penumbra Proteine identifiziert werden, die mit regenerativen Prozessen wie Synapto- oder Angiogenese assoziiert sind. Hierzu zählen u.a. Synaptophysin, dessen Hochregulation mit einer gesteigerten Anzahl an Synapsen sowohl in der ischämischen als auch in der nicht-ischämischen Hemisphäre korreliert (Stroemer 1998), der Gefäßendothel-abhängige Wachstumsfaktor (VEGF) als angionetisch wirksamer Faktor (Hayashi 1997) sowie die bereits genannten Wachstumsfaktoren FGF (Finklestein 1990) und EGF. Mit diesen Beobachtungen korreliert die Annahme, dass das ischämiebedingt veränderte Umgebungsmilieu im Gehirn die Differenzierung der aus dem Blut einwandernden Zellen begünstigen kann. Die entsprechenden Experimente wurden zumeist an Ratten durchgeführt. Eglitis et al. unterzogen die Versuchstiere fünf bis sechs Wochen nach systemischer Knochenmarktransplantation einer transienten fokalen cerebralen Ischämie und

beschrieben das Vorkommen GFAP-positiver hämatogener Zellen in beiden Großhirnhemisphären (Eglitis 1999). Dabei war der relative Anteil dieser Zellen an allen Astrozyten in der ischämischen Hemisphäre (4,7%) größer als auf der gegenüberliegenden Seite (1,8%). Eine weitere Arbeitsgruppe markierte Knochenmarkszellen mit Bromodesoxyuridin (BrdU) und brachte sie durch direkte intrastriatale Injektion oder durch Infusion in die ipsilaterale A. carotis interna (Li 2001) an den Ort des Infarkts. Bei den dabei verwendeten Zellen handelte es sich entweder um Knochenmarksgemisch (Chen 2000a) oder um stromale Knochenmarkszellen, die mittels ihrer Adhäsionseigenschaft isoliert worden waren (Chen 2000b, Li 2000, Li 2001). In einer Arbeit wurden sogar stromale Knochenmarkszellen der Ratte in das ischämische Striatum adulter Mäuse transplantiert (Li 2000). In allen Fällen fanden die Autoren im Gehirn BrdU-markierte Donorzellen, die anhand ihrer Immunoreaktivität für NeuN und das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2, Li 2001) bzw. GFAP als Neurone bzw. Astrozyten identifiziert werden konnten.

### 3 Herleitung der Aufgabenstellung

Die Fragestellung, die am Beginn der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente stand, lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: Besitzen Zellen aus dem Knochenmark von adulten Mäusen das biologische Potential, sowohl zu Mikrogliazellen als auch zu Astrozyten zu differenzieren? Enthält adultes Knochenmark also Zellen, die unter geeigneten Bedingungen nicht nur ein mehr als multipotentes Differenzierungsspektrum entfalten, sondern mit der Expression eines makroglialen Phänotyps auch gleichzeitig die Barriere zwischen Mesoderm/Mesenchym und Ektoderm überschreiten können? Als die in den folgenden Kapiteln dargestellten Versuche im Frühjahr 1999 begonnen wurden, bestand die einzige Evidenz eines makroglialen Differenzierungspotentials adulter Knochenmarkzellen in den von Eglitis und Azizi vorgelegten Arbeiten (Eglitis 1997, Azizi 1998, Eglitis 1999). Hier wurde erstmals beschrieben, dass Knochenmarkzellen im Gehirn eine Entwicklung durchlaufen können, die mit der Expression von GFAP (Eglitis) oder einem astrozyten-ähnlichen Migrationsverhalten (Azizi) verbunden sein kann. Zur Überprüfung dieser Befunde boten sich zwei experimentelle Ansätze an:

1. Eine Möglichkeit bestand in der Transplantation adulter Mäuse mit ebenfalls adultem Knochenmark, das eine stabile Markierung aufweist, welche erstens im Rahmen der Zellproliferation nicht verloren geht und zweitens die übertragenen Zellen und ihre Abkömmlinge eindeutig vom Gewebe des Empfängertieres unterscheidbar macht. Ein solches Modell war in unserem Labor in Form der GFP-Knochenmarkchimäre etabliert; hierbei werden Knochenmarkzellen *ex vivo* mit dem EGFP-Gen retroviral transfiziert und in letal bestrahlte Empfängertiere transplantiert.
2. Im Rahmen der Zusammenarbeit mit dem MDC Berlin stand ein weiteres Chimärenmodell für die Bearbeitung der oben gestellten Frage zur Verfügung: Die Transplantation von Knochenmark



aus transgenen Mäusen, die EGFP ausschließlich unter der Kontrolle des humanen GFAP--Promoters – d. h. in Astrozyten - exprimieren, bot die Möglichkeit, von einer „verborgenen Markierung“ Gebrauch zu machen, die nur bei einer Umdifferenzierung der Donorzellen zu GFAP-exprimierenden Astrozyten zum Tragen kommen sollte. Da Eglitis et al. postulieren, dass die Expression von GFAP durch hämatogene Zellen im Gehirn von Knochenmarkchimären besonders nach cerebraler Ischämie gesteigert ist (Eglitis 1999), wurde das Modell des experimentellen Schlaganfalls, d. h. der transienten fokalen cerebralen Ischämie, in unsere Versuche einbezogen. Angesichts der Tatsache, dass noch keine Zellkulturarbeiten hierzu publiziert worden waren, wurden auch *in vitro*- Versuche konzipiert. Dabei eröffneten sich zahlreiche Möglichkeiten, was die spezifischen Kulturbedingungen betrifft. Die Entscheidung fiel für zwei verschiedene Modelle, denen der Versuch gemeinsam ist, ein den physiologischen Verhältnissen im Gehirn möglichst ähnliches Mikromilieu zu erzeugen: Die Kokultur von transfizierten, GFP--markierten Knochenmarkzellen und Knochenmarkzellen aus GFAP-GFP-Mausmutanten erfolgte zum einen auf konfluenten primären Astrozytenkulturen und zum anderen auf organotypischen, entorhinal-hippocampalen Hirnschnittkulturen, die in Zusammenarbeit mit dem Institut für Anatomie der Charité präpariert und kultiviert wurden. Es wurden keine Wachstums- oder Differenzierungs-faktoren eingesetzt. Für die durchgeführten Zellkulturversuche spielte auch die Fragestellung eine Rolle, ob Knochenmarkzellen unter den gegebenen Bedingungen den Phänotyp ruhender Mikroglia annehmen. Dieser Ansatz beruhte auf drei Befunden:

1. Mikrogliazellen gelten entwicklungsgeschichtlich als mesenchymaler bzw. hämatogener Herkunft.

2. Sievers et al. konnten in der Kokultur auf Astrozyten die Differenzierung humaner Monozyten und Milzmakrophagen zu ruhender Mikroglia zeigen (Sievers 1994a, Sievers 1994b).

3. In eigenen Versuchen mit murinen Knochenmarkchimären konnten Hinweise dafür erbracht werden, dass auch im adulten Organismus Zellen aus dem Blut ins Gehirn einwandern und dort zur Population der ramifizierten Mikroglia beitragen (Priller et al. 2001).

Die durchgeführten Experimente hatten zum Ziel, die angewandten Modelle im Hinblick auf die oben formulierten Fragestellungen zu evaluieren.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

*Tabelle 4-1: Folgende Materialien, Geräte und Versuchstiere fanden Verwendung*

Produkt	Herkunft
5-Fluorouracil	Sigma, Deisenhofen
Antikörper: anti-GFAP (rabbit, polyclonal)	DAKO, Hamburg
Antikörper: anti-Iba	Dr. Y. Imai, Tokyo, Japan
Antikörper: anti-rabbit, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Antikörper: anti-Sca-1	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Sca-1-Magnetic Beads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhofen
Bestrahlungsquelle 1	<sup>60</sup> Co, Siemens, Strahlenklinik der Charité
Bestrahlungsquelle 2	<sup>137</sup> Cs, Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin
Bicarbonat	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	DAKO, Hamburg
Cellquest Software für Apple-Macintosh	Becton Dickinson, Heidelberg
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Co-trimoxazol (Cotrim E)	Ratiopharm, Ulm
D-Glucose	Sigma, Deisenhofen
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Gibco, Eggenstein
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Einbettmedium	Lipshaw, Pittsburgh, PA, USA

FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Foetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Gelatine 2%	Sigma, Deisenhofen
Halothan ASID	Büsch, Böblingen
Insulinspritzen 1 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
IVC-Regal ( <i>isolated ventilation cage sytem</i> )	Charles River, Sulzfeld
Kanülen 23 G	Terumo, Leuven, Belgien
Kanülen 25 G	Braun, Melsungen
KHCO <sub>3</sub>	Sigma, Deisenhofen
Kryostat HM 500 OM	Microm/Zeiss, Walldorf
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
MACS-Separatorsäulen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MethoCult GF® Spezialmedium	Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop 1: Leica DMRA	Leica, Heidelberg
Mikroskop 2: Leica DMIL	Leica, Heidelberg
Mikroskop 3: Olympus	Olympus, Hamburg
<i>Modified Eagle's Medium (MEM)</i>	Gibco, Eggenstein
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NH <sub>4</sub> Cl	Sigma, Deisenhofen
Objektträger Superfrost Plus und Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
<i>PCR-Materialien</i>	
- S.N.A.P. whole blood DNA isolation kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande

- Primer (GFP-Gen)	PD Dr. Frank Kirchhoff, MPI Göttingen
Penicillin	Biochrom, Berlin
Perfusionsmaschine Ecoline V-280	Ismatec, Wertheim
Petrischalen , steril (3 cm Durchmesser)	Falcon, Heidelberg
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS ohne Calcium und Magnesium bzw. PBS w/o)	Gibco, Eggenstein
Pasteurpipetten (Kunststoff)	Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polybrene	Sigma, Deisenhofen
Propidiumiodid	Becton Dickinson, Heidelberg
RHuIL-6 (Interleukin-6)	PromoCell, Heidelberg
rMuIL-3 (Interleukin-3)	PromoCell, Heidelberg
rSCF ( <i>stem cell factor</i> )	Amgen, Thousand Oaks, CA, USA
Streptavidin-Cy-3	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Streptavidin-Texas Red	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Streptomycin	Biochrom, Berlin
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
Tiere 1: NMRI-Mäuse, Wildtyp	Zucht Abt. für exp. Neurologie, Charité, Berlin Zucht Institut für Anatomie, Charité, Berlin
Tiere 2: C57bl6-Mäuse, Wildtyp	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz u. Veterinärmedizin, Berlin Zucht Institut für Anatomie, Charité, Berlin
Tiere 3: C57bl6-Mäuse, transgen	Prof. Dr. Okabe, Universität Osaka, Japan
Tiere 4: FVBxC57bl6-Mäuse, transgen	PD Dr. Frank Kirchhoff, Max-Delbrück-Zentrum für molekulare Medizin, Berlin

Tiere 5: FVBxC57bl6-Mäuse, Wildtyp	PD Dr. Frank Kirchhoff, Max-Delbrück-Zentrum für molekulare Medizin, Berlin
Triton X-100	DAKO, Hamburg
Trypsin	Biochrom, Berlin
Virus-Producer-Zelllinie	Dr. Derek A. Persons, St. Jude Children's Hospital, Memphis, Tennessee, USA
Zellkultureinsätze	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten (24 wells)	Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten (6 wells)	Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Greiner
Zentrifugen	Becton Dickinson, Heidelberg
Ziegenserum ( <i>Normal Goat Serum</i> )	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

## 4.2 Versuche in vivo

### 4.2.1 Die GFAP/GFP-transgene Donormaus

Die Frage nach dem makroglialen Differenzierungspotential hämatogener Zellen im Gehirn der adulten Maus wurde am Modell der Knochenmarkchimäre untersucht. Das dazu verwendete Donor-Knochenmark stammte aus transgenen Mäusen, die das GFP-Gen unter der Kontrolle eines 2,2 kb langen Fragments aus dem humanen Promoter für GFAP exprimieren. Heterozygote Donortiere des Stammes C57bl6 x FVB/N wurden uns freundlicherweise von Herrn PD Dr. Frank Kirchhoff, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen, zur Verfügung gestellt. Das Modell dieser transgenen Maus wurde am Max-Delbrück-Centrum in Berlin entwickelt, um die nur an fixiertem Gewebe durchführbare immunhistochemische Anfärbung von GFAP dadurch zu umgehen, dass EGFP als Markerprotein konstitutiv in lebenden Astrozyten exprimiert wird (Nolte 2001). Dies ermöglicht die Identifizierung und elektrophysiologische Untersuchung von Astrozyten z. B. in vitalen Hirnschnittpräparaten. Grundlage unserer Versuche mit Knochenmark aus diesen Donortieren war die Hypothese, dass die Hand in Hand gehende Expression von GFAP und EGFP in makroglialen Zellen ein geeignetes Instrument darstellt, eine Differenzierung hämatogener Zellen zu GFAP-exprimierenden Astrozyten *in vivo* oder in der Zellkultur zu dokumentieren. Die von Nolte et al. beschriebene transgene Maus unterscheidet sich in bezug auf Fortpflanzungsfähigkeit, Verhalten und Lebenserwartung nicht von Wildtyp-Exemplaren des gleichen Stammes. Allein anhand morphologischer und lokalisatorischer Kriterien können die im Gehirn der transgenen Tiere präsenten EGFP-positiven Zellen als Astrozyten identifiziert werden; sie weisen zahlreiche weitverzweigte Zellfortsätze auf, in die hinein sich das (cytoplasmatische) grüne Fluoreszenzsignal fortsetzt (Nolte 2001, Abb. 5, 6) EGFP-positive Zellen mit astrozytärer Morphologie finden sich in besonders großer Zahl im Cerebellum (Mole-

kularschicht, Körnerschicht) sowie in Neocortex, Basalganglien, Hippocampus, Album, Retina und Rückenmark. Nach GFAP-Färbung fixierter Gewebeschnitte erweist sich die weitaus größte Zahl dieser Zellen als immunoreaktiv für GFAP; Koexpression von GFP mit neuronalen und oligodendrozytären Markern wie NeuN und dem Myelin-assoziierten Glykoprotein finden sich dagegen nicht (Nolte 2001). Die zelluläre Kollokalisierung von GFP und GFAP im Hirnparenchym weist insofern regionale Inhomogenität auf, als in bestimmten Bereichen (z. B. im Thalamus) intensive Grünfluoreszenz mit einem äußerst schwachen GFAP-Signal einhergeht, während anderswo Astrozyten deutliche Immunoreaktivität für GFAP, aber eine interzellulär stark variierende Expression von GFP aufweisen (Nolte 2001). In bezug auf die Intensitätsunterschiede des GFAP-Signals deckt sich diese Beobachtung mit den Befunden von McLendon, der die ungleichmäßige Anfärbbarkeit der Astrozyten u. a. mit ihrem jeweiligen Aktivitätszustand und ihrer Lokalisation in Zusammenhang bringt (McLendon 1994). Von der Anwesenheit des genetischen Konstrukts in allen Körperzellen der transgenen Mäuse konnte aufgrund theoretischer Erwägungen ausgegangen werden; der positive Nachweis dafür war bei jedem einzelnen Tier durch PCR-Analyse von genomischer DNA aus Schwanzgewebe erbracht worden.

#### **4.2.2 Auswahl und Bestrahlung der Rezipienten**

Als Empfängertiere dienten FVBxC57bl6-Mäuse, die sämtlich aus der gleichen Zucht stammten wie die Donormaus, dabei aber das Transgen nicht aufwiesen, was zuvor mittels PCR Kirchhoff bei jedem einzelnen Tier verifiziert worden war. Zur Bestrahlung und Rekonstitution wurden nur klinisch gesunde Tiere herangezogen. Die myeloablative Bestrahlung erfolgte fraktioniert in zwei Sitzungen mit einem Intervall von drei Stunden. Die Strahlendosis betrug bei jeder Fraktion 5,5 Gy, in der Summe also 11 Gy. Es wurde eine  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle verwendet.



#### **4.2.3 Gewinnung von Knochenmark aus GFP/GFAP-transgenen Donortieren**

Zur Entnahme des Knochenmarks wurden die Donortiere nach Anästhesie in Halothan (4%)- oder Chloralhydratnarkose durch zervikale Dislokation getötet. Nach gründlicher äußerlicher Desinfektion mit Ethanol 70% wurden die unteren Extremitäten vom Rumpf getrennt. Dann wurde zunächst der Schädel eröffnet und zusätzlich das Gehirn entnommen, um vor der Entnahme und weiteren Aufbereitung des Knochenmarks die Transgenität der Tiere, d. h. die Grünfluoreszenz ihrer Astrozyten, in „Schnellschnittechnik“ noch einmal fluoreszenzmikroskopisch zu verifizieren. Anschließend wurden Tibiae und Femores vom Muskel- und Sehngewebe freipräpariert und in frisches steriles PBS w/o verbracht. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter der Zellkulturbank. Nach Anbohrung der Epiphysen wurde jeder einzelne Knochen mehrfach mit jeweils 1 ml PBS w/o + 2% hitzeinaktiviertem FKS (4 °C) durchspült, die gewonnene Zellsuspension in einem Falcon-Röhrchen (50 ml) aufgefangen und auf Eis deponiert. Nach zweimaliger Zentrifugation (12 min bei 1000 rpm und 4 °C) und Resuspension in PBS w/o mit 2% FKS wurde ein Aliquot für die Quantifizierung der kernhaltigen Zellen entnommen. Nachdem die Zellen gezählt waren, wurden sie unmittelbar vor der Transplantation in PBS w/o mit 2% FKS suspendiert. Zur Prophylaxe thrombembolischer Komplikationen nach Injektion wurde die Zelllösung mit 50 µl einer Heparinlösung (250 U/l) im Verhältnis 1:10 versetzt.

#### **4.2.4 Transplantation und Haltung der Tiere**

Mittels einer 1-ml-Insulinspritze wurden pro Maus  $5 \times 10^6$  Zellen in 500 µl Injektionslösung in eine Schwanzvene injiziert. Nach sorgfältiger Blutstillung mit einem Wattetupfer wurden die Tiere einzeln in speziell vorbereitete Filterkäfige verbracht und in ein IVC-Regalsystem hineingestellt. Durch die isolierte Ventilation eines jeden Käfigs mit gefilterter Raumluft sowie durch

die Verwendung von autoklaviertem Futter, Wasser und Einstreumaterial wurde versucht, wie-  
testgehende Keimarmut zu erreichen. Das Trinkwasser enthielt zur weiteren Infektionsprophyla-  
xe Cotrimoxazol in einer Konzentration von 3,5 Vol.-%. Entsprechend den Erfahrungen unserer  
Arbeitsgruppe mit der Überlebensfähigkeit knochenmarktransplantierte Mäuse wurden die Tiere  
für maximal vier Wochen unter diesen Bedingungen gehalten.

#### **4.2.5 Dokumentation des Rekonstitutionserfolges**

Das alleinige Überleben der transplantierten Mäuse reicht als Beweis der erfolgreichen Rekonsti-  
tution nicht aus, weil es keine Aussage darüber erlaubt, in welchem Ausmaß das Knochenmark  
entweder von Donorstammzellen oder auch von nur überlebenden autochthonen Zellklonen re-  
populiert wurde. Aus diesem Grund wurde 6 bis 8 Wochen nach Transplantation die Anwesen-  
heit des transgenen Konstrukts im peripheren Blut der chimären Tiere mit Hilfe der Polymerase-  
Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen. Nach Inzision der Schwanzvene wurden jeder Maus 150 µl  
Blut entnommen, aus denen die DNA unter Verwendung des *S. N. A. P. whole blood DNA isola-  
tion kit* isoliert wurde. Die PCR wurde mit *Primern* für das GFP-Gen durchgeführt (*sense*: 5' --  
GCC GCT ACC CCG ACC AC – 3'; *antisense*: 5' - TTC ACC TTG ATG CCG TTC TTC T –  
3'), wobei die Amplifikationsbedingungen folgendermaßen lauteten: 3 min 94°C, 40 Zyklen: 1  
min 94°C, 1 min 55°C, 90 s 72°C, 5 min 72°C. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-  
Gel (1%) aufgetrennt und unter Verwendung von Ethidiumbromid visualisiert.

#### **4.2.6 Transiente fokale cerebrale Ischämie**

Das von Hara et al. beschriebene „Fadenmodell“ der transienten fokalen cerebralen Ischämie ist  
in der Abteilung für experimentelle Neurologie seit Jahren etabliert und konnte von Dr. Konstan-

tin Prass in die hier vorgestellten Experimente eingebracht werden (Hara 1996). Der auf dem temporären Verschluss einer A. cerebri media beruhende Eingriff wurde 12 Wochen nach Transplantation an den Chimären durchgeführt (bzw. 6 Wochen nach positivem Nachweis des Genkonstrukts im peripheren Blut). Unter Allgemeinnarkose mit 1% Halothan in einem Gemisch aus 70% Lachgas (N<sub>2</sub>O) und 30 % Sauerstoff (O<sub>2</sub>) wurde zuerst die Sonde eines Laser-Doppler-Flow-Messgerätes links parietal auf dem Schädelknochen befestigt. Danach wurde der linke Bulbus caroticus freipräpariert und ein silikonbeschichtetes Monofilament in die A. carotis interna der gleichen Seite eingeführt. Der Faden wurde so weit nach kranial vorgeschoben, dass er den Abgang der A. cerebri media verlegte, was bei jedem Tier durch eine Abnahme des links-hemisphäralen Blutflusses in der Dopplermessung dokumentiert wurde. Nach 60 Minuten wurden die Tiere kurz renarkotisiert, um das Filament wieder zu entfernen und den Präparationssitus mit Acryl-Gewebekleber zu verschließen. Die Reperfusions- bzw. Überlebenszeiten betrugen 1 bis 5 Tage.

#### **4.2.7 Histologie und Immunhistochemie**

Zum gewählten Zeitpunkt wurden die Tiere mit Chloralhydrat i. p. narkotisiert und unter Verwendung einer Perfusionsmaschine transkardial nacheinander mit eisgekühltem PBS (2 min) und 4% Paraformaldehyd (PFA, 10 min) perfundiert. Die Gehirne wurden schonend entfernt und über Nacht in 4% PFA in PB nachfixiert. Anschließend wurden sie zur Kryoprotektion so lange in einer 30%-Lösung von Sucrose in Aqua bidest. aufbewahrt, bis sie auf den Boden des Lagerungsgefäßes abgesunken waren. Danach wurden die Hirne auf Trockeneis tiefgefroren und bis zum Schneiden bei -80°C gelagert. Die Herstellung von 20 µm dicken Kryoschnitten erfolgte am Kryostaten bei -24 °C. Jeder zehnte Schnitt wurde unter dem konventionellen Fluoreszenzmikroskop systematisch auf das Vorkommen GFP-positiver Zellen untersucht. An weiteren Schnitten

wurde eine immunhistochemische Färbung mit Visualisierung des GFAP-Antigens durchgeführt. Zur Verwendung kamen dabei der Primärantikörper anti-GFAP aus Kaninchen (1:500), ein biotinylierter anti-rabbit-Sekundärantikörper (1:200) sowie der an Streptavidin gekoppelte rote Fluoreszenzfarbstoff Texas Red oder Cy-3 (Emissionsmaxima: Texas Red 602 nm, Cy-3 596 nm). Im Falle der Tiere, die einer fokalen cerebralen Ischämie unterzogen worden waren, wurden repräsentative Schnitte aus allen Hirnregionen mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt, um den Infarkt dokumentieren und sein Ausmaß einschätzen zu können (HE-Färbeprotokoll: 3 s Ethanol 80%, Spülung mit Wasser, 3 s Hämatoxylin nach Papanicolaou, Spülung mit Wasser, 3 s Acetalcohol, 1 s Lithiumcarbonat 1%, Spülung mit Wasser, aufsteigende Alkoholreihe bis 96%, 5-10 s Eosin, Spülung mit Wasser, mehrfaches Eintauchen in reinen Alkohol, zum Schluss 10-30 s Rothistol, Eindeckeln).

### **4.3 Versuche in vitro**

#### **4.3.1 Transfektion von Knochenmark mit EGFP**

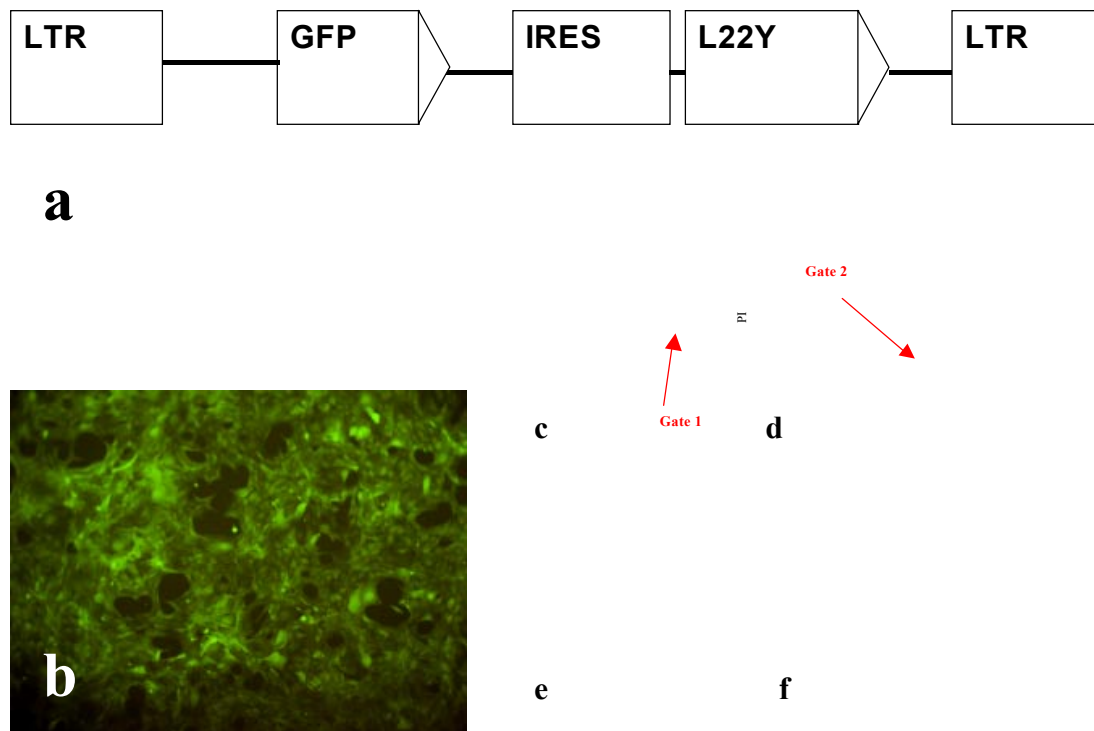
Im Rahmen der *in vitro*-Versuche wurden Knochenmarkzellen auf Mausastrozyten oder organotypischen Hirnschnitten kokultiviert. Um die spätere Identifizierung der Knochenmarkzellen eindeutig zu ermöglichen, wurden die (unreiferen) Zellen vor Anlage der o. g. Kokulturen retroviral mit EGFP transfiziert (Bierhuizen 1990, Persons 1997). Die Entnahme und Transfektion des Knochenmarks erfolgten entsprechend eines von uns modifizierten Protokolls von Persons et al. (Persons 1997).

#### **4.3.2 Knochenmarkentnahme**

Als Donortiere für die Transfektion von Knochenmarkszellen mit GFP dienten 12 Wochen alte, weibliche und klinisch gesunde NMRI-Mäuse (Zucht PD Dr. Ute Lindauer, Charité). Zur Effizienzsteigerung des Gentransfers bei der Kultur von Knochenmarkzellen auf Virus-Producer-Zellen (s. u.) wurden die Donortiere mit 5-Fluorouracil in einer Dosierung von 150 mg/kg Körpergewicht i. p. vorbehandelt. Der zytotoxische Effekt dieses Pyrimidin-Antagonisten wirkt sich am schwächsten auf hämatopoetische Stammzellen mit langfristigem Repopulationspotential aus (Lerner 1990, Okada 1992) und steigert die Empfänglichkeit der behandelten Knochenmarkzellen für eine retrovirale Infektion in Anwesenheit der Zytokine IL-3 und IL-6 (Bodine 1991). 48 Stunden später erfolgte die Gewinnung des Knochenmarks wie unter 4.2.3. beschrieben.

### 4.3.3 Retroviraler Gentransfer in murine Knochenmarkstammzellen

Zur Vorbereitung der eigentlichen Transfektion wurden die entnommenen Knochenmarkzellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in DMEM mit 15 % hitzeinaktiviertem FKS, 3,25 g/l D-Glucose, 2 mmol/l L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in Anwesenheit von 20 ng/ml Interleukin-3 (rMuIL-3), 50 ng/ml Interleukin-6 (rHuIL-6) und 50 ng/ml Stem Cell Factor (rSCF) kultiviert (Prästimulation). Die Dauer dieser Kultur betrug 48 Stunden bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. Anschließend wurden die Knochenmarkzellen auf eine Fibroblastenlinie transferiert, die den retroviralen Vektor MGirL22Y exozytiert (Persons 1997). Dieser enthält unter anderem das Gen für EGFP (Abb. 1). Die Virus-Producer-Zellen waren einen Tag zuvor mit 13 Gy aus einer <sup>60</sup>Co-Quelle bestrahlt und anschließend in mittlerer Dichte ( $3,5 \times 10^6$  Zellen/75 cm<sup>2</sup>) in gelatinisierten Kulturflaschen ausgesät (0,1% Gelatine in PBS) worden. Nach 48 Stunden Kokultur in dem bereits oben genannten Medium mit Zusatz von 600 ng/ml Polybrene wurden die transfizierten Knochenmarkzellen entnommen und gezählt. Bei einem Teil der durchgeführten Experimente erfolgte während der Prästimulations- und Transfektions-Kultur eine Markierung proliferierender Knochenmarkzellen mittels Brom-desoxyuridin (BrdU), das in einer Konzentration von 3 µmol/l der Zellsuspension täglich zugesetzt wurde.



**Abbildung 1:**

**Charakterisierung der Virus-Producer-Zelllinie für die retrovirale Transfektion von Knochenmark mit EGFP. a:** Schematische Darstellung des retroviralen MGirL22Y-Vektors. Das abgebildete Fragment ist 3,6 kb lang und enthält die cDNA für EGFP sowie das humane Enzym Dihydrofolatreductase (L22Y). IRES = internal ribosomal entry site (Enzephalomyokarditis-Virus), LTR = long terminal repeats. Der Grundbaustein des Vektors ist ein Plasmid aus dem murinen Stammzell-Virus (MSCV). **b:** Die virusproduzierenden Fibroblasten weisen ein homogenes und helles GFP-Signal auf (x100). **c – f:** Die graphische und numerische Darstellung der FACS-Analyse zeigt, dass eine Mehrheit der Fibroblasten EGFP mit hoher Intensität exprimiert. Eine Subpopulation der Virus-Producer-Zellen (Gate 1 in c) wurde mit Hilfe von Propidiumjodid (PI) auf ihre Viabilität geprüft; die vitalen Zellen (Gate 2 in d) wurden selektiert und hinsichtlich ihrer GFP-Expression untersucht (e, f).

#### **4.3.4 Dokumentation des Transfektionserfolges**

Nach mehrmaligem Waschen der Knochenmarkzellen aus der Kokultur mit jeweils 1,5 ml frischem Kulturmedium wurden 50.000 Zellen abgezweigt und in 2 ml Methylcellulose-Medium (MethoCult GF®) aufgenommen. Nach gründlicher Suspension auf dem Minishaker (1000 rpm) wurde die erhaltene Zelllösung in einer sterilen Petrischale unter Standardbedingungen kultiviert. 7 bis 10 Tage später erfolgte die Auszählung der Zellkolonien sowohl unter dem Licht- als auch unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop. Aufgrund des selektiven Wachstums hämatogener Vorläuferzellen in Spezialmedium (MethoCult GF®) spiegelte der relative Anteil GFP-exprimierender Zellkolonien (= Zellklone) die Effizienz der Transfektion wider (Inhaltsstoffe des MethoCult GF®-Mediums: Methylcellulose, Iscove's MDM, fötales Kälberserum, bovines Serumalbumin, bovines Pankreasinsulin, humanes Transferrin, 2-Mercaptoethanol, L-Glutamin, rMuIL-3, rHuIL-6, rMuSCF, rHu Erythropoetin).

#### **4.3.5 Knochenmarkentnahme aus $\beta$ -Actin/GFP- und GFAP/GFP-transgenen Mäusen**

Knochenmarkzellen mit konstitutiver Expression von GFP wurde aus transgenen C57bl6--Mäusen entnommen. Bei diesem von Okabe et al. entwickelten transgenen Modell ist die Expression des EGFP-Gens unter die Kontrolle des  $\beta$ -Actin-Promoters (aus Huhn) gestellt (Okabe 1997, Hajdantonakis 1998, Kawakami 1999). Da  $\beta$ -Actin als wichtiger Zytoskelettbaustein in praktisch allen Körperzellen von Säugetieren präsent ist, weisen die transgenen Mäuse fast ubiquitäre GFP-Expression auf: Mit Ausnahme von Erythrozyten und Haaren ist EGFP bei adäquater Exzitation in allen Körpergeweben nachweisbar. Trotz der massiven Akkumulation des Fremdproteins in allen Organen konnte von den o. g. Autoren kein Hinweis auf eine systemisch oder lokal manifeste zelltoxische Wirkung des EGFP gefunden werden; die Tiere zeigen keine



Auffälligkeiten in bezug auf Verhalten, Fortpflanzung und Lebenserwartung (Okabe 1997). Die Knochenmarkentnahme aus  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen und GFAP/GFP-transgenen Donormäusen erfolgte entsprechend dem weiter oben beschriebenen Protokoll. Die Zellen wurden jeweils direkt nach Entnahme für die Kokulturversuche vorbereitet.

#### **4.3.6 Präparation und Kultur muriner Astrozyten**

Murine Astrozyten zur Herstellung von Monolayers für die Kokultur mit GFP-markierten Knochenmarkzellen wurden nach einem Standardprotokoll gewonnen (McCarthy und de Vellis 1980). Nach Dekapitation von 4 – 6 neugeborenen NMRI-Mäusen (P1-P3, Zucht Ute Lindauer, Charité) bzw. C57bl6-Mäusen (P1-P3, BgVV, Berlin) wurden die Hirne schonend aus den Kalotten entfernt und in eine mit PBS gefüllte Petrischale verbracht. Unter dem Präparationsmikroskop (Vergrößerung x10) wurden nach Entfernung von Kleinhirn, Bulbus olfactorius, Diencephalon und Hippocampus die verbleibenden Cortexhälften vorsichtig von ihrem meningealen Überzug befreit. Danach wurden die Cortices mit einem Skalpell zerkleinert und über 15 Minuten im Wasserbad (37 °C) durch Inkubation mit 10 ml Trypsin 0,05% enzymatisch dissoziiert. Nach zweimaligem Waschen des Gewebes in PBS wurden die Zellen in Astrozytenmedium suspendiert, mit der Pipette vereinzelt und in 75–cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät. Das Astrozytenmedium bestand aus DMEM, 10% hitzeinaktiviertem FKS, 1,0 g/l D-Glucose, 2 mmol/l L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Ein Wechsel des Mediums fand alle zwei Tage statt. Nach einer weitgehenden Konfluenz der Zellen erreicht war, wurden die Astrozyten einmalig passagiert und mit einer Dichte von 40.000/well in 24-well-Zellkulturplatten ausgesät. Die Astrozytenkulturen wurden erst nach Ausbildung eines gleichmäßigen Monolayers zur Kokultur mit Knochenmarkzellen herangezogen.

#### **4.3.7 Präparation und Kultur muriner entorhinal-hippocampaler Hirnschnitte (OEHSC)**

Nach Dekapitation neugeborener NMRI-Mäuse (P9-P12, Institut für Anatomie, Charité) bzw. C57bl6-Mäuse (P8-P11, Institut für Anatomie, Charité) wurden die Hirne schonend herausgelöst und sofort in eisgekühltes Präparationsmedium verbracht (Savaskan 2000). Nach Entfernung des Kleinhirns und Halbierung des Großhirns in der Frontalebene wurden von jeder Hirnhälfte einzeln horizontal geführte, 300 µm dicke Vibratomschnitte der Hippocampusregion angefertigt. Jeweils 2 bis 3 Schnitte wurden mit Hilfe eines Pinsels in einen sterilen Zellkultureinsatz mit poröser Bodenmembran verbracht (Porendurchmesser 0,4 µm) und anschließend in die mit 1 ml Kulturmedium gefüllte Vertiefung einer Zellkulturplatte überführt. Die Kultivierung der Schnitte erfolgte bei 35 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. Das Kulturmedium wurde erstmals am Tag nach der Präparation, danach alle 48 Stunden erneuert. Die OEHSC fanden erst nach einer sogenannten „Silencing“-Periode von 5 bis 7 Tagen weitere Verwendung, wodurch das Abklingen der inflammatorischen Gewebereaktion nach Präparation abgewartet wurde (Hailer 1996). Zusammensetzung des Präparationsmediums: MEM 16 g/l, steriles Aqua dest., L-Glutamin 2 mmol/l, Trisbase 8 mmol/l. (Zusammensetzung des Kulturmediums: MEM 8 g/l, steriles Aqua dest., 25% Pferdeserum, Bicarbonat 7,5% 5,8 ml/l, Ascorbinsäure 800 ng/l, L-Glutamin 2 mmol/l, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Trisbase 5 mmol/l, Glucose 2,4 g/l, HBSS 25%, Insulin 100 µl.)

#### **4.3.8 Auftrennung von Knochenmarkzellen mittels MACS**

Zur Untersuchung des unterschiedlichen Differenzierungsverhaltens früherer und späterer Entwicklungsstufen von Knochenmarkzellen in der Kultur auf Astrozyten oder lebenden Hirnschnittpräparaten diente die Separation der Zellen entsprechend ihrer Sca-1-Expression. *Stem*

*cell antigen 1* ist ein Oberflächenmolekül (van de Rijn 1989), das bei Mäusen auf hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark und auf einigen Vertretern der T-Zell-Reihe exprimiert wird (Spangrude 1988, Spangrude 1989). Zusammen mit anderen membranständigen Proteinen wie c-kit und den sog. *lineage markers* wird es als Markerantigen für die durchflusszytometrische Isolierung hämatopoetischer Vorläuferzellen aus murinem Knochenmark verwendet (Furukawa 1998). Die resultierende Population enthält zelluläre Vorstufen mit unterschiedlichen Differenzierungsspektren, d. h. sowohl multipotente Stammzellen mit langfristiger Selbsterneuerungsfähigkeit als auch determiniertere Zelltypen (Cheshier 1999). Sca-1 ist besonders für die Isolierung sehr primitiver Vorläuferzellen von Bedeutung. Die Auftrennung der transfizierten Knochenmarkzellen entsprechend ihrer Sca-1-Expression erfolgte unmittelbar vor Anlage der Kokulturen und wurde mittels MACS (*magnetic activated cell sorting*) durchgeführt. Nach Entnahme aus der Transfektions-Kokultur und Hämolyse mittels eines Puffergemisches (0,01 M  $\text{KHCO}_3$ , 0,155 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1 mM EDTA) wurden die Knochenmarkzellen in PBS gewaschen und für 30 Minuten bei 4 °C mit Sca-1+-*magnetic microbeads* inkubiert (20 µl auf  $10^7$  Zellen). Danach wurde die Zellsuspension auf eine zuvor mit 500 µl PBS durchspülte Separatorsäule gegeben, in der die Sca-1-positiven Zellen primär zurückgehalten wurden. Nachdem die Sca-1--negative Fraktion einschließlich der Spülflüssigkeit (PBS) aufgefangen worden war, konnten die Sca-1-positiven Zellen durch nochmalige Spülung der Säule mit 1 ml PBS mobilisiert und kollektiert werden. Beide Zellfraktionen wurden gezählt; zur Spezifitätskontrolle wurde anschließend eine durchflußzytometrische Analyse der Sca-1-positiven und Sca-1-negativen Population durchgeführt (Becton Dickinson FACSCalibur-Gerät, Software: Cellquest auf Apple Macintosh).

#### 4.3.9 Kokultur von Knochenmarkzellen auf Astrozyten-Monolayers

GFP-transfizierte Knochenmarkzellen, die in einem experimentellen Ansatz zusätzlich mit BrdU markiert waren, wurden in drei verschiedenen Fraktionen auf Mausastrozyten ausgesät: Sca-1-positive Zellen, Sca-1-negative Zellen und unfractionierte Knochenmarkzellen. Knochenmarkzellen aus  $\beta$ -Actin-GFP-transgenen und GFAP-GFP-transgenen Mäusen wurden vor Anlage der Kokultur keiner MACS-Prozedur unterzogen und als Gemisch auf die Astrozyten gegeben. Bei jedem der verschiedenen Versuchsansätze (s. Abb. 2) erfolgte die Beimpfung der Astrozyten mit 10.000 Knochenmarkzellen pro *well*. Der nächstfolgende Mediumwechsel (DMEM mit 10% FKS) fand 24 Stunden später statt, alle weiteren in 48-Stunden-Intervallen. Dabei wurde jeweils die Hälfte des Mediums vorsichtig abpipettiert und durch die gleiche Menge an frischem Kulturmedium ersetzt. Die Dauer der Kokultur erstreckte sich über längstens 18 Tage. Am 1., 3., 6., 12. und 18. Tag nach Versuchsbeginn wurden pro experimentellem Ansatz 4 *wells* mit Paraformaldehyd 4% in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) fixiert. Bei den Experimenten mit transfiziertem Knochenmark wurden außerdem zu jedem Zeitpunkt die Zellen zweier *wells* vor der Fixierung enzymatisch mobilisiert (0,05% Trypsin), in 500  $\mu$ l Medium suspendiert und durch Zytocentrifugation (10 min, 500 rpm, Raumtemperatur) auf gelatinisierte Objektträger aufgebracht. Bei allen Kokulturexperimenten wurden, soweit möglich, identische Stämme von Mäusen für die Gewinnung von Knochenmarkzellen einerseits und Astrozyten andererseits verwendet (NMRI oder C57bl6). Diejenigen Zellen, die aus GFP/GFAP-transgenen Tieren (Stamm: C57bl6 x FVB) gewonnen worden waren, wurden auf Astrozyten aus C57bl6-Mäusen kultiviert.

#### **4.3.10 Kokultur von Knochenmark auf Organotypischen entorhinal-hippocampalen Hirnschnitten**

Transfizierte Knochenmarkzellen wurden ebenfalls in zwei Fraktionen auf OEHSC aufgeimpft: Sca-1-positive Zellen und Sca-1-negative Zellen. Knochenmark aus  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen und GFAP/GFP-transgenen Mäusen wurde jeweils als Gemisch aus Sca-1-positiven und Sca-1-negativen Zellen auf die Hirnschnittkulturen gegeben. Auf jeden *Slice* wurden 100.000 Knochenmarkzellen, suspendiert in 5  $\mu$ l Medium, mit einer Eppendorf-Pipette appliziert. Der erste Mediumwechsel fand 24 Stunden später statt, alle nachfolgenden im 48-Stunden-Rhythmus. Dabei wurde der im jeweiligen *well* befindliche 1 ml Medium vollständig ausgetauscht. Die Dauer der Kokultur betrug maximal 8 Tage. Zu den Zeitpunkten 3, 5 und 8 Tage wurden pro Versuchsansatz 2-3 Hirnschnitte mit Paraformaldehyd 4% und Glutaraldehyd 0,1% in 0,1 M PB fixiert. Die Schnitte wurden nun für 8 bis 10 Tage in einer Lösung von 20% Sucrose in Aqua bidest. gelagert, um das Gewebe vor den potentiell destruktiven Auswirkungen des Einfrierens zu schützen (Kryoprotektion): Unmittelbar vor dem Schneiden wurde jeder *Slice* bei  $-34^{\circ}\text{C}$  im Kryostaten in Einbettmedium tiefgefroren. Die bei gleicher Temperatur hergestellten, 14  $\mu$ m dicken Schnitte wurden schließlich auf gelatinierte Objektträger aufgebracht, an der Luft getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt.

#### **4.3.11 Kontrollen, Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie**

Das Hauptaugenmerk der Zellkulturexperimente lag auf dem Einfluss unterschiedlicher zellulärer Wachstumsmilieus auf das makro- und mikrogliale Differenzierungsverhalten von Knochenmarkzellen. Zur Untersuchung der Frage, welchen Einfluss diffusible und nicht diffusible Faktoren in der Zellkultur auf den Differenzierungsvorgang haben könnten, wurde jeder Ver-

suchsansatz mit einer Kontrolle durchgeführt, bei der die Kultur von Knochenmarkzellen auf azellulären Substraten erfolgte. Im Falle der Kokultur auf Astrozyten bestand der Kontrollansatz in der Kultur entsprechender Populationen von Knochenmarkzellen in unbeschichteten Polyethylen-Zellkulturflaschen. Als Nährlösung wurde dabei konditioniertes Astrozytenmedium verwendet, das zuvor im Rahmen des alle 48 Stunden durchgeführten Mediumwechsels in der konfluierenden Stammkultur gewonnen, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren worden war. Parallel zur Kokultur auf *OEHSC* wurden Knochenmarkzellen in identischen Fraktionen in Zellkultureinsätzen mit porösen Membranen kultiviert. Da *Slice*-konditioniertes Medium aus technischen Gründen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand, fand hierbei das nicht-konditionierte Kulturmedium Anwendung. Alle Präparate wurden immunhistochemisch auf die Expression mehrerer Antigene untersucht: Zum Nachweis einer möglichen astrozytären Zelldifferenzierung wurde ein Primärantikörper gegen das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) verwendet. Als immunhistochemisches Kriterium der mikroglialen Differenzierung diente der Nachweis des Iba-1-Antigens. Hierbei handelt es sich um ein kalziumbindendes Protein (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*), das auf ZNS-Mikrogliazellen und Makrophagen exprimiert wird (Imai 1996, Ito 1998). Die Integration von inkorporiertem BrdU in die nukleäre DNA wurde durch einen BrdU-Primärantikörper erfasst. Anti-BrdU stammte aus der Ratte, alle übrigen Primärantikörper aus dem Kaninchen. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Präparate für 45 Minuten mit einem Gemisch aus 10% Ziegenserum (NGS, *normal goat serum*), 1,0% BSA (bovinem Serumalbumin) und 0,1% Triton-X-100-Lösung in PBS w/o inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung vorsichtig abgeschüttet und ohne Waschvorgang der primäre Antikörper in 0,1%-Triton-X-100 mit 2% Schafserum aufgetragen (Verdünnungen: anti-GFAP 1:500, anti-Iba-1 1:70 bis 1:100). Die Inkubation erfolgte über Nacht ( $> 18$  Stunden) bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Nach Entfernung des Primärantikörpers durch Waschen mit PBS (3 x 10 min auf dem Schüttler) wurde der biotinylierte anti-rabbit-Sekundärantikörper auf die Präparate gegeben (aus der Ziege,

Verdünnung 1:200 in PBS mit 2% Schafserum). Auf erneuten Zusatz von Triton-X-100 als Detergens zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurde dabei verzichtet. Im Anschluss an die ein- bis zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur folgten erneut drei Waschvorgänge in der oben beschriebenen Form. Schließlich wurden die Präparate für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem geeigneten, an Streptavidin (SA) gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff inkubiert. Es fanden die im grünen Fluoreszenzlicht rot erscheinenden Farbstoffe SA-Texas-Red und SA-Cy-3 Verwendung. Vor der Eindeckelung der Präparate wurden nicht gebundene Farbstoffpartikel durch gründliches Waschen in PBS entfernt. Das Protokoll der BrdU-Färbung unterschied sich von diesem Vorgehen in folgenden Punkten: Inkubation in 2 M HCl (37°C, 1 h) vor Applikation von 3% NRS (*normal rabbit serum*), Konzentration von anti-BrdU 1:200, Konzentration eines biotinylierten anti-rat-Sekundärantikörpers (aus Kaninchen) 1:250. Alle immunhistochemischen Färbungen wurden routinemäßig mit einer Kontrolle durchgeführt: Bei ansonsten unverändertem Färbeprotokoll wurde der Primärantikörper durch PBS w/o ersetzt, womit eine etwaig auftretende unspezifische Färbung von Präparatstrukturen durch den Sekundärantikörper oder Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht werden kann. Die Verlaufsbeobachtung der Kultur von Knochenmarkzellen auf OEHSC vor der Fixierung wurde mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt (Olympus). Zur Auswertung der Versuche nach Fixierung und Immunhistochemie diente bei der Astrozyten-Kokultur ebenfalls ein inverses Fluoreszenzmikroskop (Leica DMIL), bei den auf Objektträger aufgebrachten Zellen bzw. OEHSC hingegen ein konventionelles Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRA).

## 5 Ergebnisse

Im folgenden werden die verwendeten experimentellen Ansätze noch einmal schematisch dargestellt:

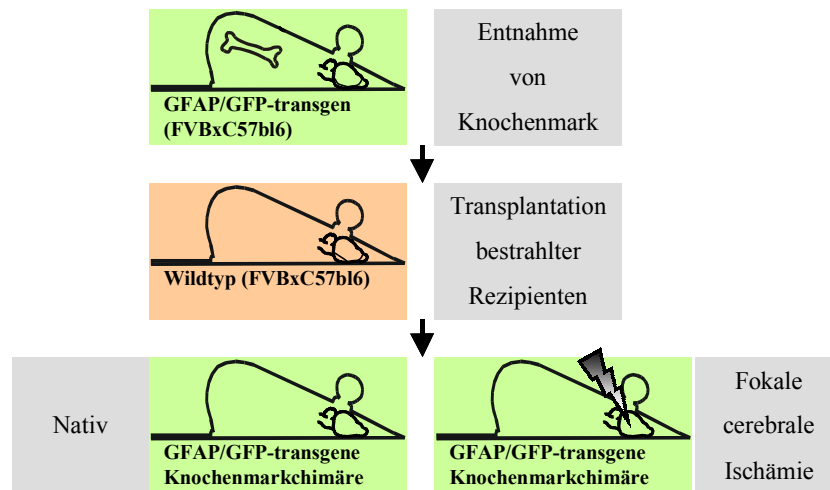


Abbildung 2: Übersicht über die in vivo Experimente

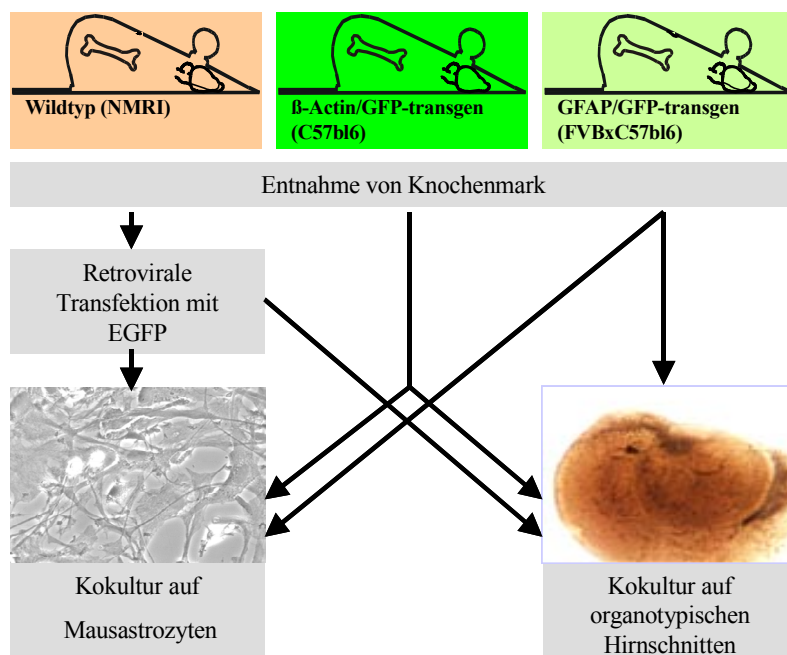


Abbildung 3: Übersicht über die in vitro Experimente



## 5.1 Ergebnisse der in vivo - Versuche

### 5.1.1 Etablierung von GFAP/GFP-Knochenmarkchimären

Die für die Knochenmarkentnahme verwendeten GFAP-GFP-Donormäuse wurden zuvor durch PCR-Analyse von Gewebekomogenisat aus einer Schwanzbiopsie als transgen bestätigt. Unmittelbar vor der Verwendung des Knochenmarkes wurden diese Tiere noch einmal auf ihre Transgenität hin untersucht. Die zu diesem Zweck entnommenen nativen Gehirne der Donoren zeigten bereits bei normalem Tageslicht eine grün-gelbe Färbung des Cerebellums, die sich bei Anregung mit blauem Fluoreszenzlicht deutlich verstärkte und – mit geringerer Intensität - auf das gesamte Gehirn ausdehnte (Abb. 4 a – c). Zur weiteren mikroskopischen Untersuchung wurden die Hirne in PFA 4% nachfixiert. Im Album und Griseum der Donormäuse fanden sich zahlreiche sternförmige Zellen mit verzweigten Zellfortsätzen und intensivem GFP-Signal (Abb. 5, 6). Sie wurden aufgrund ihrer immunhistochemisch nachgewiesenen GFAP-Expression als Astrozyten identifiziert. Auffällig waren dabei regionale Unterschiede in der Reaktivität der Astrozyten mit anti-GFAP. Auch das GFP-Signal war nicht in allen Zellen von gleicher Intensität (Abb. 6). Beide Befunde wurden von Nolte et al. im Rahmen der Charakterisierung dieses transgenen Modells beschrieben (Nolte 2001). Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte die elektrophysiologischen Eigenschaften der GFP-positiven Zellen mittels *Patch-clamp*-Technik, wobei sich die gemessenen Membranströme als für Astrozyten charakteristisch herausstellten. Bei einem Donortier untersuchten wir auch Blutausstrich und Knochenmark auf die Expression von GFP hin, die in beiden Fällen nicht vorhanden war. In der Zusammenschau belegen diese Daten, dass GFP in den verwendeten transgenen Mäusen spezifisch in Astrozyten exprimiert wird.

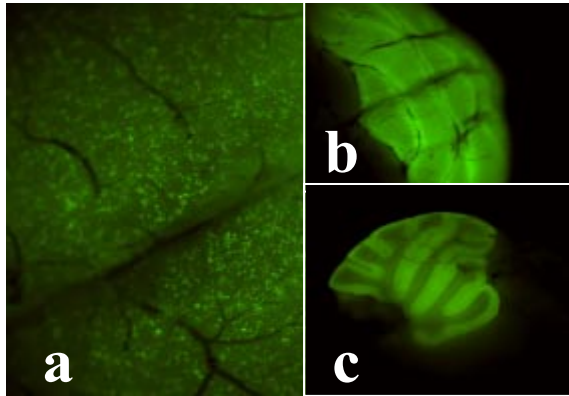


Abbildung 4:

Expression von GFP im Gehirn der GFAP/GFP-transgenen Donormaus. Bei 25-facher Vergrößerung sind im fluoreszierenden Auflicht zahlreiche GFP-exprimierende Zellen auf der Cortexoberfläche des frisch entnommenen Gehirns zu erkennen (**a**). Die starke Grünfluoreszenz der Kleinhirnrinde (**b**, Aufsicht und **c**, Sagittalschnitt, jeweils x25) kommt durch die für das Modell charakteristische intensive Expression von GFP in der Bergmann-Glia zustande.

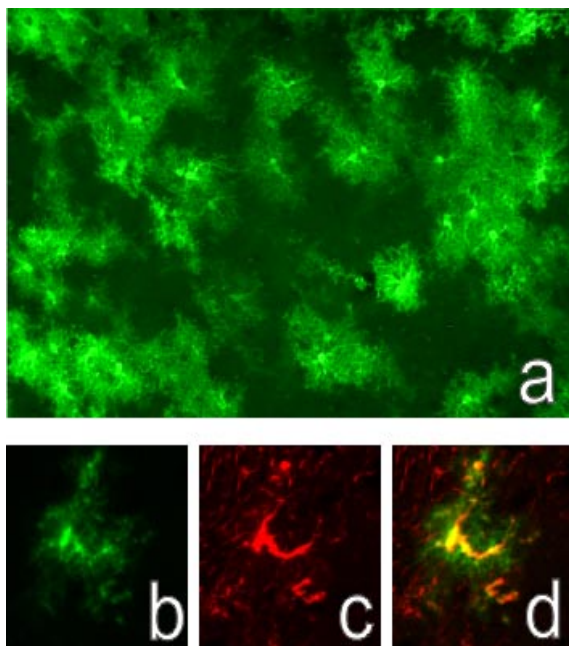


Abbildung 5:

Charakterisierung der GFAP/GFP-transgenen Donormaus für die Knochenmarktransplantation. In einem nativen Gefrierschnitt (20  $\mu$ m) des Striatums finden sich zahlreiche Zellen mit intensiver Grünfluoreszenz (**a**, x200). Die Zellen besitzen ein dichtes Geflecht feiner Zytoplasmafortsätze, in denen das GFP-Signal etwas schwächer ausgeprägt ist als im Zelleib (**a**, **b**). Die konfokalen Teilabbildungen **b** - **d** (x400) zeigen jeweils die gleiche Zelle: GFP-Fluoreszenz (**b**), GFAP-Färbung (**c**), Überlagerung beider Signale (**d**).

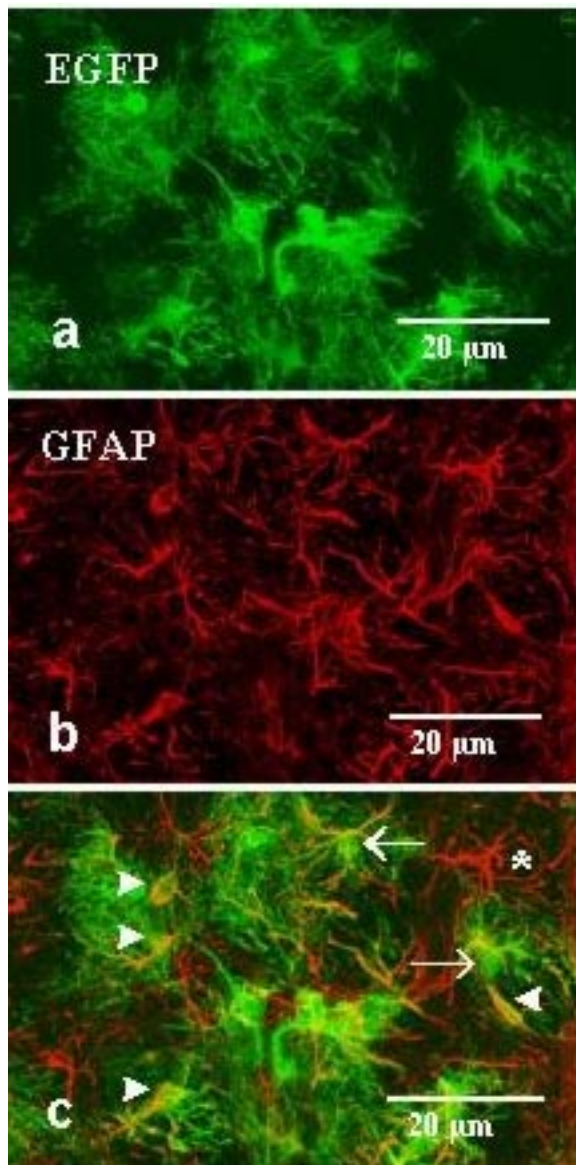
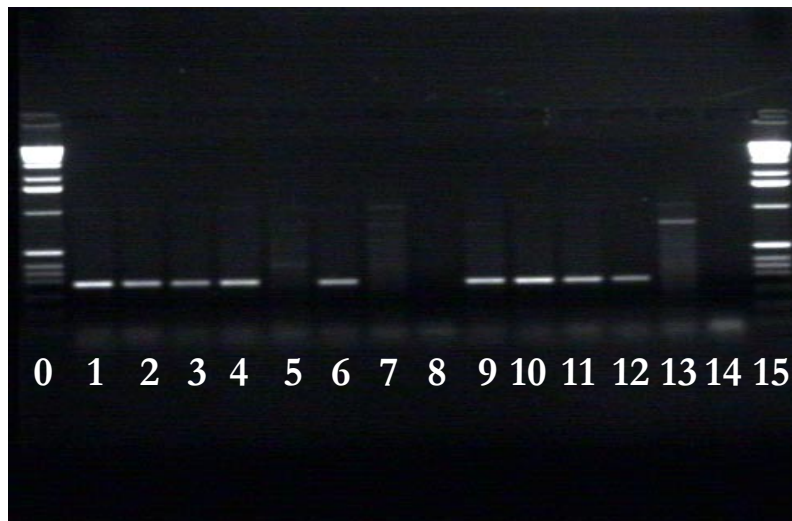


Abbildung 6:

Charakterisierung der GFAP/GFP-transgenen Donormaus für die Knochenmarktransplantation. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie angefertigt und zeigen GFP-positive Astrozyten im Cortex eines drei Monate alten transgenen Tieres (**a**). Nach immunhisto-chemischer Anfärbung von GFAP (**b**) und Überlagerung (**c**) erweisen sich mehrere Zellen als doppelt markiert (Pfeilspitzen in **c**). Die Stärke des GFAP-Signals in Astrozyten ist bei in vivo-Färbungen physiologischerweise inhomogen; einige GFP-positive Zellen zeigen eine geringere Immunoreaktivität für GFAP (Pfeile in **c**). Eine GFAP-positive Zelle exprimiert kein GFP (Stern in **c**). Die Bilddaten wurden aus einem Gewebesegment von 230 mm x 130 mm x 13 mm Größe errechnet.

Insgesamt wurden 17 Wildtypmäuse des Stammes FVBxC57bl6 mit Knochenmark aus transgenen Donoren transplantiert. Ein Tier starb wenige Tage nach der Transplantation, während alle übrigen Chimären nach sechs Wochen lebten und im Blutausstrich eine normale Morphologie der Erythrozyten und Leukozyten aufwiesen. Mittels PCR-Analyse von genomischer Leukozyten-DNA wurde zum gleichen Zeitpunkt die Präsenz des transgenen Konstrukts im peripheren Blut aller Tiere überprüft. Lediglich bei 3 Tieren war das Transgen nicht nachweisbar, so dass bei ihnen von einer ungenügenden Repopulation des Knochenmarks durch die applizierten Donorzellen ausgegangen werden musste. Die 13 verbleibenden Chimären waren Träger des transgenen Konstrukts in Leukozyten und wurden für die Versuche herangezogen (Abb. 7).



*Abbildung 7:*

*Nachweis des transgenen Konstrukts in Leukozyten aus dem peripheren Blut mittels PCR. Die PCR-Produkte aus einer Transplantationsserie wurden auf einem Agarose-Gel separiert und anschließend mit Ethidiumbromid visualisiert. Die verwendeten Primer detektierten das GFP-Gen.*

*Lanes 0 und 15: DNA molecular weight marker (1kb)*

*Lanes 1 und 2: GFAP/GFP-transgene Donormäuse*

*Lanes 3, 4, 6 und 9 – 12: Knochenmarkchimären. Das Transgen ist vorhanden.*

*Lanes 5, 7 und 8: Knochenmarkchimären. Das Transgen ist nicht vorhanden.*

*Lane 13: Negativkontrolle der spezifischen Genamplifikation (nicht transplantierte Maus).*

*Lane 14: Negativkontrolle der PCR (ohne DNA).*

Durch den auf diese Weise erbrachten positiven Nachweis der erfolgreichen Rekonstitution blieb allerdings die Frage unbeantwortet, ob bei den chimären Tieren Blutzellen, die sich vom transgenen Donorknochenmark herleiten, auch dazu in der Lage sind, ins Zentralnervensystem einzuwandern. Für die Überprüfung dieser grundsätzlichen Fähigkeit war es erforderlich, ein Transplantationsexperiment mit Knochenmark durchzuführen, bei dem die übertragenen Zellen zuvor - unabhängig vom Transgen - eine stabile Markierung erhalten hatten. Diese Bedingung konnte durch die retrovirale Transfektion des transgenen Donor-Knochenmarks mit EGFP erfüllt werden. Durch Transplantationsversuchen mit GFP-transfiziertem Wildtyp-Knochenmark war bekannt, dass markierte Zellen aus dem Blut weit ins Gehirn der Chimären (C57bl6) einwandern und dort anhand ihres intensiven Fluoreszenzsignals gut detektierbar sind (Priller et al., 2001a). Dieser Prozess findet sowohl kontinuierlich nach Transplantation als auch massiv nach zusätzlicher cerebraler Ischämie statt. Der Großteil der intraparenchymatös gelegenen Zellen ist stark ramifiziert und zeigt Immunoreaktivität für mikrogliale Marker wie Iba-1 und F4/80 (Abb. 8), was die Hypothese unterstützt, dass sich die Population der Mikrogliazellen auch in der adulten Maus teilweise aus einwandernden Blutzellen rekrutiert.

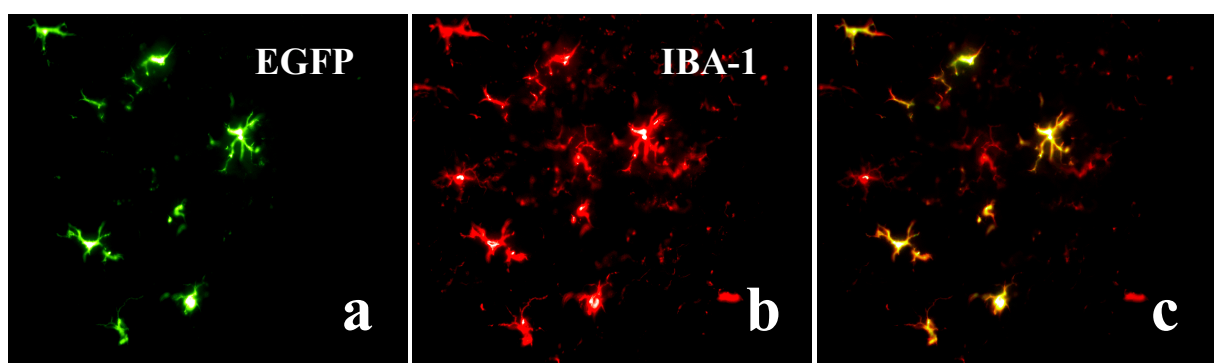


Abbildung 8:

*Mikrogliazellen im Hirnparenchym einer GFP-Knochenmarkchimäre (C57bl6). Vier Wochen nach Transplantation von GFP-transfiziertem Knochenmark (nicht transgen!) erscheinen ramifizierte Donorzellabkömmlinge im Bulbus olfactorius und im weiteren Verlauf auch in anderen Hirnregionen. In diesem Bulbuspräparat sind die GFP--positiven Zellen stark ramifiziert (a) und exprimieren den Makrophagen-Marker Iba-1 (b, c Überlagerung). Die weiße Färbung der zentralen Cytoplasmabereiche kommt durch Überstrahlungsartefakte zustande. Vergr. x250.*

Aufgrund dieser Befunde konnte davon ausgegangen werden, dass die Markierung von Knochenmark per Transfektion mit EGFP ein geeignetes Mittel darstellt, den oben geforderten Beweis zu erbringen. Nachdem das Knochenmark aus den GFAP/GFP-transgenen Donoren entnommen worden war, wurde ein Teil der Zellen *in vitro* mit dem EGFP-Gen transfiziert. Das genaue Vorgehen entsprach dabei dem Protokoll, das im Kontext der Zellkulturversuche beschrieben ist (vgl. Abschnitt 4.3). Es folgten die Aufbereitung und Transplantation der Zellen in 2 letal bestrahlte Rezipienten. Der Erfolg der Transfektion wurde durch Kultur einer kleinen Zellfraktion in Spezialmedium dokumentiert (vgl. Abschnitt 4.3.1.3). Vier Wochen nach Transplantation wurden beide Chimären einer fokalen cerebralen Ischämie unterzogen. Durch FACS--Analyse von Vollblut aus beiden Mäusen konnte der Anteil GFP-exprimierender Zellen an allen Mac-1-positiven Monozyten im peripheren Blut auf 69,3 % bzw. 16,6 % beziffert werden. Die Überlebenszeiten der Tiere nach Ischämie betrugen 5 und 14 Tage. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Gehirne zeigte in beiden Fällen massive Infiltrate GFP-positiver Zellen im Infarktgebiet, aber auch zahlreiche ramifizierte Zellen in größerer Entfernung zum ischämischen Areal oder auch in der kontralateralen Hemisphäre (Abb. 9). Die Zellen mit mikroglialer Morphologie zeigten eine Kolo-kalisation von GFP und Iba-1 (Abb. 9).

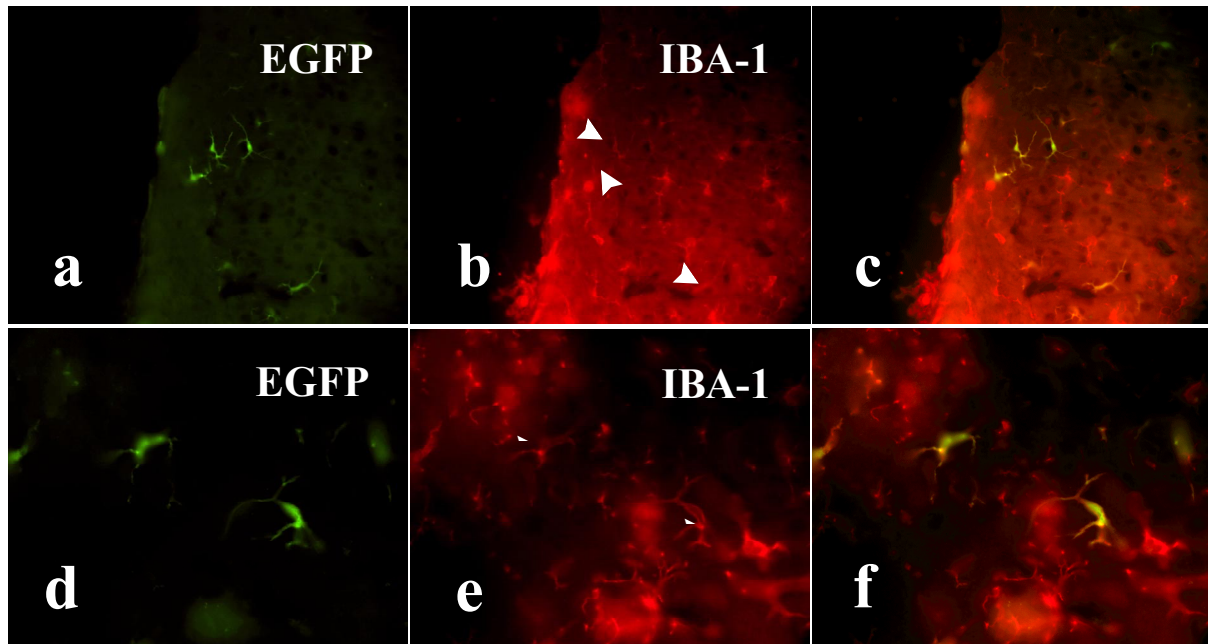


Abbildung 9: Um nachzuweisen, dass hämatogene Zellen nach Repopulation des blutbildenden Systems durch GFAP/GFP-transgene Donorzellen ins Hirnparenchym einwandern, wurden letztere vor der Transplantation mit EGFP transfiziert. Die Abbildungen wurden von Hirnschnittpäparaten zweier Knochenmarkchimären 6 Wochen nach Transplantation und 3 bzw. 5 Tage nach MCAO angefertigt (**a – f**: Maus Nr. 1, **g – i**: Maus Nr. 2). Sowohl im infarktfernen ipsilateralen Cortex (**a – c**, x250) als auch in der striatalen Perinfarktzone (**d – f**, x400, und **g – i**, x400) finden sich ramifizierte Zellen im Parenchym, die EGFP und den mikroglialen Marker Iba-1 koexprimieren.

### 5.1.2 Nativscreening

Zwei der 13 erfolgreich rekonstituierten Knochenmarkchimären wurden ohne weitere Intervention 4 Monate nach Transplantation getötet. Nach Entnahme und Aufbereitung der Hirne wurden ausgewählte Schnitte einer immunhistochemischen Gliafärbung (anti-GFAP) unterzogen, die ein normales Verteilungsmuster der Astrozyten in der grauen und weißen Substanz zeigte. Jeder zehnte angefertigte Schnitt wurde unter Einbeziehung beider Hemisphären nach GFP--exprimierenden Zellen durchsucht. In keinem der analysierten Hirnschnitten aller Tiere fanden sich GFP-positive Zellen.



### 5.1.3 Tiere nach fokaler cerebraler Ischämie

In Anlehnung an die Arbeit von Eglitis et al. (Eglitis 1999), in der ein permissiver Effekt der cerebralen Ischämie auf die astrozytäre Differenzierung hämatogener Zellen postuliert wird, wurden acht Knochenmarkchimären 6 bis 12 Wochen nach Transplantation einer fokalen cerebralen Ischämie unterzogen. Bei jedem Tier wurde die Abnahme des linkshemisphärischen Blutflusses durch Laser-Doppler-Flowmetrie dokumentiert. Die Okklusion der A. cerebri media dauerte 60 min (n = 6) oder war permanent (n=2); die Reperusionszeiten betrugen 1 bis 5 Tage. Zur Dokumentation des stattgehabten Infarktes wurde an ausgewählten Kryoschnitten eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt (Abb. 10a, 11a, 11b). Anhand histologischer Kriterien wie Nekrose, Zellhydrops und neuronaler Cytoplasmahypereosinophilie („*red neurons*“) wurde bei jedem Tier der linksseitige Infarkt bestätigt sowie dessen Ausdehnung auf Striatum und angrenzenden Cortex dokumentiert (Abb. 10a). Die immunhistochemische Färbung (anti-GFAP) weiterer Schnitte zeigte eine im zeitlichen Verlauf deutlich zunehmende Astrogliose der Perinfarktzone, während im nekrotischen Infarktkern die Expression von GFAP drastisch reduziert war (Abb. 10b, 11c). Jeder zehnte Schnitt durch den Infarkt (Frontalebene) wurde einer sorgfältigen fluoreszenzmikroskopischen Suche nach GFP-exprimierenden Zellen unterzogen, wobei neben der infarzierten auch die kontralaterale Hemisphäre Berücksichtigung fand. Weder im Infarktbereich selbst noch in der astrogliotischen Zone oder auf der Gegenseite zeigten sich Zellen mit GFP-Signal (Abb. 10c, 11d).



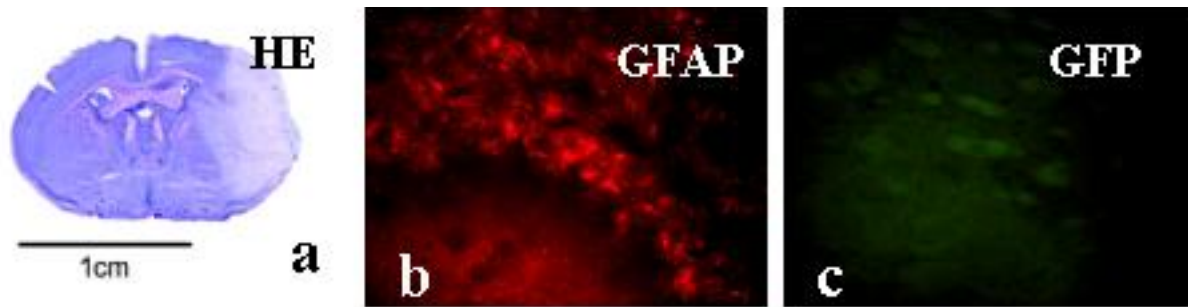


Abbildung 10:

Transiente fokale cerebrale Ischämie. Die MCAO wurde 12 Wochen nach Transplantation mit GFAP/GFP-transgenem Knochenmark durchgeführt und dauerte 60 min. Die Überlebenszeit betrug 2 Tage. Das Infarktareal umfaßt weite Teile des dorsalen Striatums und den angrenzenden Cortex (**a**, HE, nicht vergrößert). Fluoreszenzmikroskopisch sieht man, daß das GFAP-Signal im Infarktgebiet nahezu vollständig verschwunden ist, während sich perifokal ein Wall aus Astrozyten mit starker GFAP-Antigenität ausgebildet hat (**b**). Im gleichen Bereich findet sich keine Expression von GFP (**c**). Vergrößerung x200.

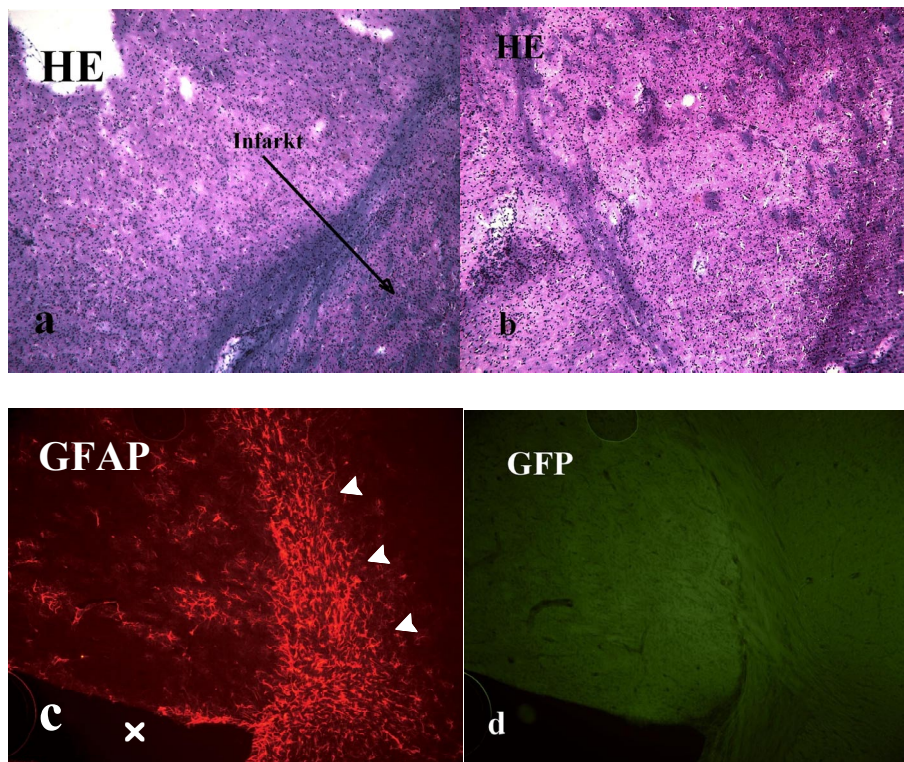


Abbildung 11:

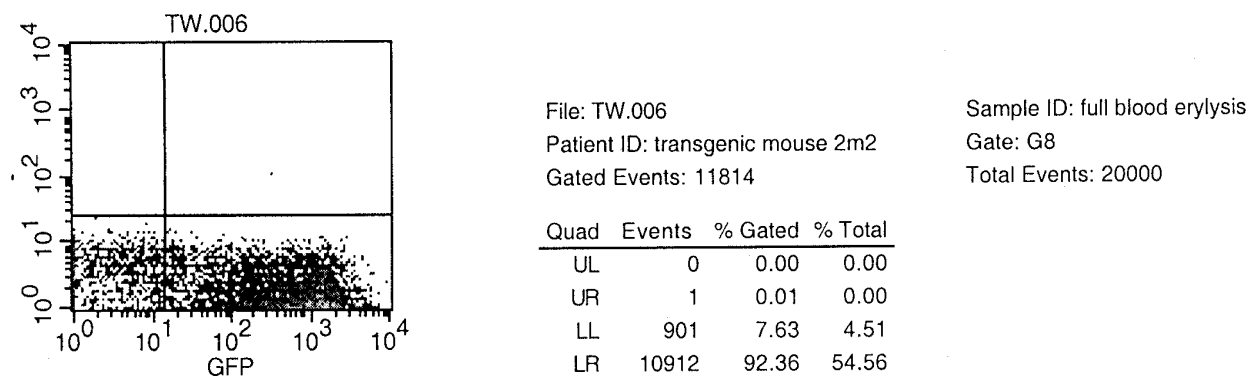
Transiente fokale cerebrale Ischämie. Die Teilabbildungen zeigen Gewebeschnitte aus dem Hirn einer GFAP/GFP-transgenen Knochenmarkchimäre. 12 Wochen nach Rekonstitution wurde das Tier einer MCAO von 60 min Dauer unterzogen. Die Überlebenszeit betrug 5 Tage. (**a**) läßt die Grenze des vorwiegend striatal lokalisierten Infarktes erkennen (Pfeile, HE, x100), **b** zeigt einen Ausschnitt aus dem betroffenen Striatum (HE, x200, x = Seitenventrikel). (**c**) Im Infarktgebiet sind nur Inseln des astrozytären GFAP-Signals erhalten. Im Bereich des Corpus callosum sieht man zahlreiche Astrozyten mit intensivem GFAP-Signal als Ausdruck der perifokalen reaktiven Astroglie (x100). Im blauen Fluoreszenzlicht ist keine GFP-Expression im selben Schnitt sichtbar (**d**, x100).

## **5.2 Ergebnisse der in vitro-Versuche**

### **5.2.1 Charakterisierung der verwendeten Knochenmarkzellen aus Donormäusen**

In den durchgeführten Zellkulturversuchen untersuchten wir das Potential muriner Knochenmarkzellen, sich unter den gegebenen Kulturbedingungen in Zellen mit makroglialen oder mikroglialen Charakteristika zu differenzieren. Die dazu verwendeten Knochenmarkzellen entstammten drei verschiedenen - darunter zwei transgenen - Donortypen. Die Transfektion von Knochenmarkzellen mit dem Gen für EGFP erfolgte mittels eines murinen Stammzellvirus. In transfizierten Knochenmarkzellen war das EGFP-Signal im Verlauf aller weiteren Experimente stabil; auch nach 18 Tagen der Kokultur auf Astrozyten hatte es von seiner Intensität kaum eingebüßt. Hinweise auf eine zytotoxische Wirkung des EGFP-Moleküls auf die transfizierten Zellen und ihre Abkömmlinge ergaben sich nicht; die erhaltene Proliferationsfähigkeit der Knochenmarkzellen konnte durch die Zunahme der Zahl GFP-positiver Zellen in den nachfolgenden Kokulturversuchen dokumentiert werden. Die Effektivität des Gentransfers wurde durch Kultivierung kleiner Mengen transfizierter Zellen in Methylcellulose-Medium untersucht. Bei der durchlicht- und fluoreszenz-mikroskopischen Auswertung dieser Kulturen fand sich regelmäßig ein über 80% liegender Anteil der GFP-positiven Zellkolonien an der Gesamtzahl aller entstandenen Kolonien. Da jede isolierte Kolonie als aus einer einzigen Vorläuferzelle hervorgegangen betrachtet werden kann (Zellklon), ergibt sich ein entsprechend hoher Prozentsatz für die Effektivität der Transfektion. Die als Donortiere verwendeten transgenen Mäuse, bei welchen das GFP-Gen an den  $\beta$ -Actin-Promoter gekoppelt war, zeigten bereits bei der Präparation eine safrangelbe Färbung des Muskel- und Fettgewebes als Hinweis auf die ubiquitäre Expression von GFP. Fluoreszenzmikroskopisch war in verschiedensten Körpergeweben dieser Tiere (Milz, Leber, Gehirn, Blutausschlag, Knochenmark) ein intensives und weitgehend homogen verteiltes

GFP-Signal zu beobachten (Abb. 12, 13). Bei der Kultur von Knochenmarkszellen erwies sich GFP als ebenfalls stabil.



**a**

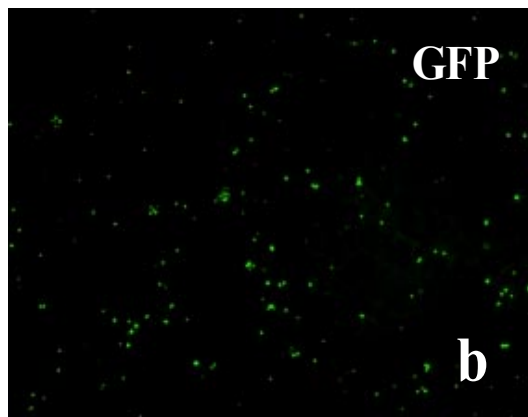
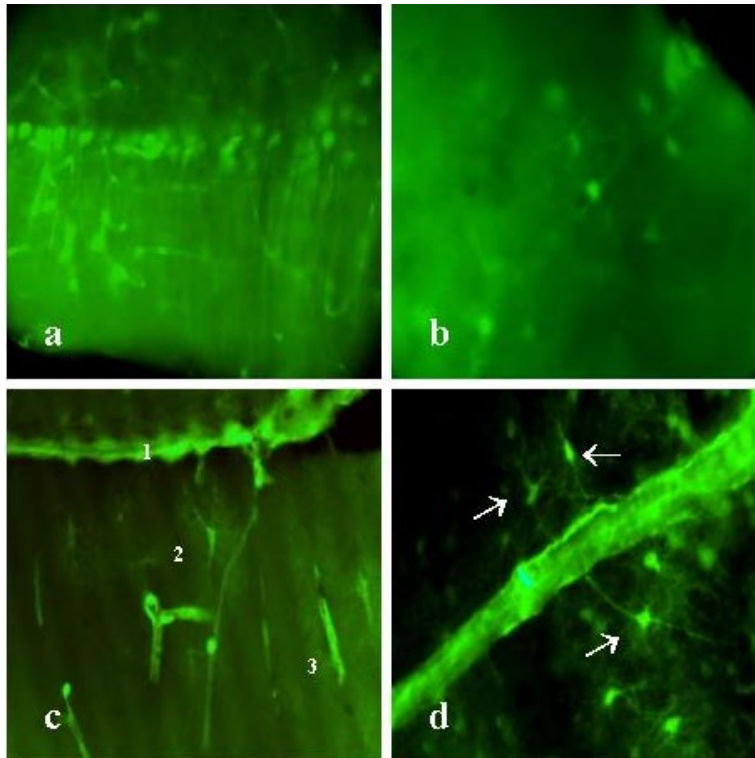


Abbildung 12:

Charakterisierung der  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen Donormaus. Das Diagramm zeigt das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse von Blutleukozyten eines transgenen Tieres (**a**). Bei den grün aufleuchtenden Partikeln im Blutaussstrich in Teilabbildung **b** handelt es sich um Thrombozyten; die Erythrozyten der  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen Tiere weisen kein GFP-Signal auf.



*Abbildung 13:*

*Charakterisierung der  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen Donormaus für die Kokultur von Knochenmark auf Astrozyten bzw. organotypischen Hirnschnitten. Im gesamten Gehirn finden sich GFP-positive Zellen unterschiedlicher Morphologie. (a) Palisadenförmig angeordnete (Purkinje-) Zellen in der Kleinhirnrinde, (b) Ramifizierte Zellen im Neocortex (Pfeile), (c) Meningeale (1), ramifizierte (2) und endotheliale Zellen (3) in der Nähe des Seitenventrikels, (d) kortikale Zellen mit neuronaler Morphologie. Die Aufnahmen stammen aus zwei verschiedenen Tieren. Vergrößerung x1000 (a, b), x400 (c, d).*

Das zweite transgene Versuchsmodell bestand in der Kultivierung von Knochenmark aus Mäusen, die EGFP unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promoters exprimieren. Auf die Charakterisierung dieses Modells wurde in Abschnitt 5.1.1. eingegangen. GFP-transfizierte Knochenmarkszellen wurden vor ihrer Verwendung in der Kokultur durch MACS nach der Expression des primitiven Stammzellmarkers Sca-1 aufgetrennt. Vor und nach dieser Prozedur wurde den Zellsuspensionen jeweils eine kleine Probe zur FACS-Analyse entnommen, um den relativen Anteil Sca-1-positiver Zellen zu bestimmen. Bereits vor Durchführung der MACS-Prozedur betrug dieser in dem Zellgemisch bis zu 69% (Abb. 14), was wir auf das begünstigte Wachstum primitiverer Vorläuferzellen in Gegenwart von IL-3, IL-6 und rSCF während der

Prästimulations- und Kokulturphase zurückführten. Die Anreicherung Sca-1-positiver Knochenmarkzellen mittels MACS gelang bis auf 85,2 % (Anteil am als Sca-1-positiv bezeichneten Eluat, Abb. 15b). Der relative Anteil Sca-1-negativer Zellen am unfraktionierten Zellgemisch betrug bis zu 31% und konnte mittels MACS auf ca. 60% (FACS-Kontrolle) nahezu verdoppelt werden (Abb. 15a).

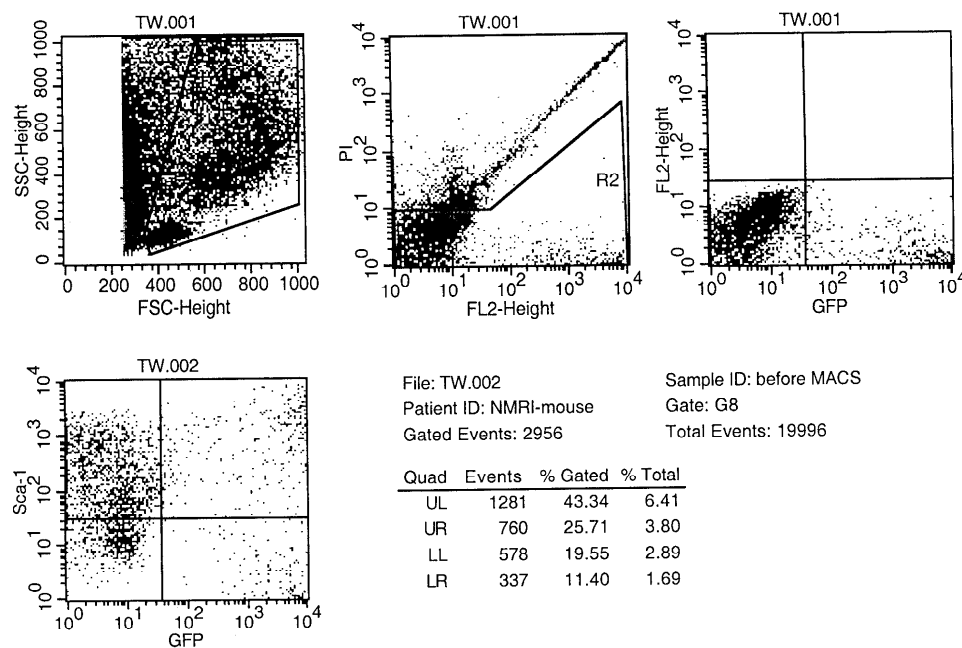
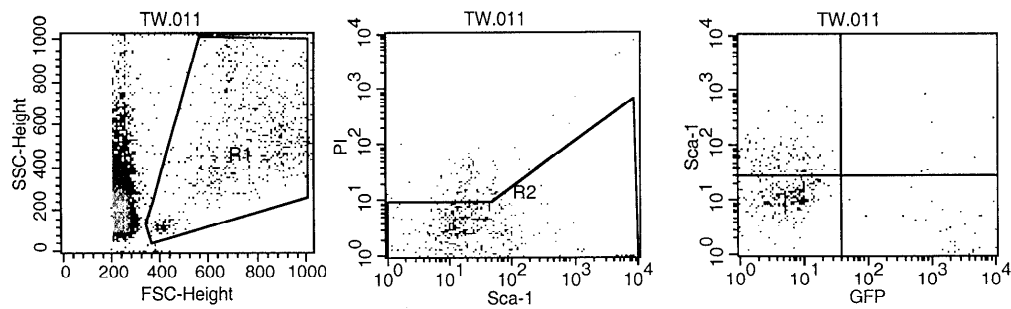


Abbildung 14:

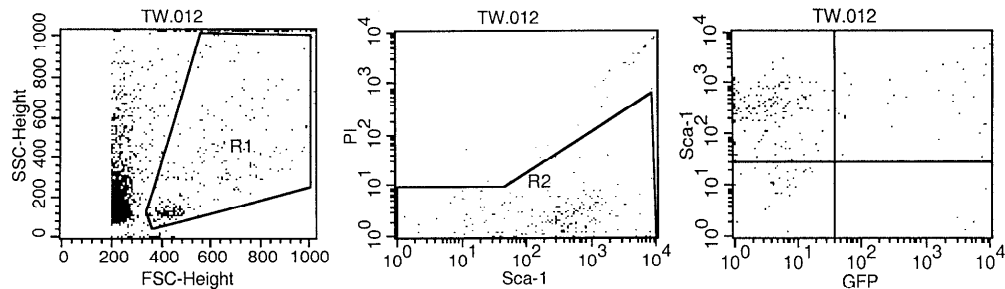
FACS-Analyse der GFP- und Sca-1-Expression GFP-transfizierter Knochenmarkzellen nach Entnahme aus der Kokultur mit Virus-Producer-Zellen, d. h. **vor** Durchführung der Zellseparation mittels MACS. Aus dem vierten Diagramm und der nebenstehenden Tabelle ist ersichtlich, dass bereits 69,05% der Zellen Sca-1-positiv sind (Summe aus beiden oberen Quadranten).



File: TW.011 Sample ID: after MACS Sca-fraction  
 Patient ID: NMRI-mouse Gate: G8  
 Gated Events: 576 Total Events: 10040

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	116	20.14	1.16
UR	109	18.92	1.09
LL	261	45.31	2.60
LR	90	15.62	0.90

**a**



File: TW.012 Sample ID: after MACS Sca+fraction  
 Patient ID: NMRI-mouse Gate: G8  
 Gated Events: 250 Total Events: 3342

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	160	64.00	4.79
UR	53	21.20	1.59
LL	29	11.60	0.87
LR	8	3.20	0.24

**b**

Abbildung 15:

FACS-Analyse von GFP-transfizierten Knochenmarkszellen **nach** MACS (gleiche Probe wie in Abbildung 14). Teilabbildung **a** zeigt die Ergebnisse der Analyse für die vorwiegend Sca-1-negative Fraktion des Eluats: Der Anteil der Sca-1-negativen Zellen beträgt hier 60,93% (Summe aus beiden unteren Quadranten des dritten Diagramms). R1: Gate nach Zellgröße, R2: Gate nach Viabilität (Propidiumjodid-Färbung). Teilabbildung **b** zeigt die Ergebnisse der Analyse für die vorwiegend Sca-1-positive Fraktion des Eluats: Der Anteil der Sca-1-positiven Zellen beträgt hier 85,2% (Summe aus beiden oberen Quadranten des dritten Diagramms). R1: Gate nach Zellgröße, R2: Gate nach Viabilität (Propidiumjodid-Färbung).

### 5.2.2 Differenzierung von Knochenmarkzellen in Kultur auf Astrozyten

Die in einer Dichte von 10.000 Zellen/well auf konfluierenden Astrozyten-Monolayers ausgesäten Knochenmarkzellen waren generell überlebensfähig. Die Anzahl der ausgewerteten Experimente betrug  $n = 4$  für transfiziertes Knochenmark und jeweils  $n = 1$  im Falle der aus den zwei verschiedenen transgenen Donoren gewonnenen Knochenmarkzellen. Bei jedem Versuchsansatz wurden 5 Zeitpunkte (1, 3, 6, 12 und 18 Tage) und zu jedem Zeitpunkt mindestens 4 wells ausgewertet. Die vor Anlage der Kokulturen erfolgte Markierung GFP-transfizierter Knochenmarkzellen mit BrdU, das von proliferierenden Zellen inkorporiert wird, diente der Prüfung des Ausmaßes, in dem transfizierte Zellen bzw. ihre Abkömmlinge im Verlauf der Zeit die Expression von GFP herunterregulieren. BrdU-markierte Zellen waren durch ihr nukleäres Fluoreszenzsignal als Knochenmarkzellen kenntlich und kolokalisierten mit dem cytoplasmatisch exprimierten GFP (Abb. 16). Die Anzahl BrdU-immunoreaktiver Zellen in der Kokultur war der der GFP-positiven Zellen im gesamten Verlauf der Kokultur annähernd proportional (Verhältnis 2:1).

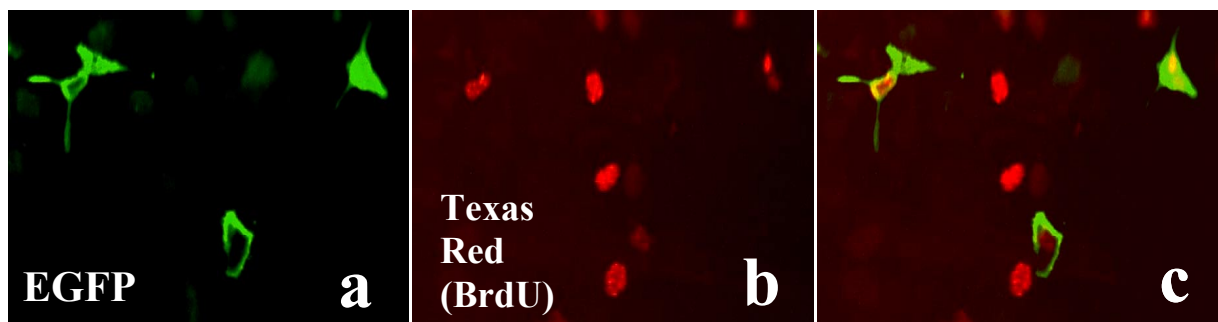


Abbildung 16:

Kokultur von GFP-transfizierten und mit BrdU markierten Knochenmarkzellen auf Astrozyten, Tag 6. Die Abbildung zeigt drei GFP-exprimierende Zellen (a), von denen zwei ein nukleäres BrdU-Signal aufweisen (b, c). Mehrere BrdU-positive Knochenmarkzellen exprimieren kein GFP. Vergrößerung  $\times 250$ .

Die mit GFP transfizierten Knochenmarkzellen erschienen unmittelbar nach Anlage der Kokultur zu 100% rund, waren nicht adhärent und zeigten 12 Stunden später Adhäsion an den zellulären Untergrund, ohne bereits morphologische Veränderungen vollzogen zu haben. Nicht adhärente Zellen verschwanden in den ersten zwei Tagen der Kokultur zusehends. Sämtliche GFP-positiven Zellen waren deutlich kleiner als die darunterliegenden, zum großen Teil flächenhaft wachsenden Astrozyten. Innerhalb der ersten 1 bis 3 Tage begannen einzelne Knochenmarkzellen Pseudopodien verschiedener Größe zu bilden, d. h. Zellfortsätze, die als wenig erhabene Ausstülpungen des Zelleibes oder als längere Struktur imponierten. Eine große Anzahl von Zellen hatte bereits eine spindelförmige Morphologie angenommen (Abb. 17). Am 6. Tag nach Beginn des Experiments zeigten 8-17 von 100 in zwei zufällig gewählten Gesichtsfeldern (x100) ausgezählten GFP-positiven Zellen einen schmalen Zelleib mit zwei oder mehr Zellfortsätzen, die sich in Sekundärfortsätze verzweigten (Abb. 18), was der klassischen Morphologie ramifizierter Mikrogliazellen *in situ* entspricht, wie sie von Hortega beschrieben wurde (del Rio Hortega 1932). Daneben fanden sich zahlreiche Zellen mit unverzweigten Fortsätzen, die sich in alle Richtungen erstreckten (Abb. 19). Zu den Untersuchungszeitpunkten 12 und 18 Tage war keine weitere Verzweigung EGFP-exprimierender Zellen im Sinne der Bildung von Tertiärfortsätzen zu verzeichnen. Der Anteil der ramifizierten Zellen lag bei 11-21% (12. Tag) bzw. 10-19% (100 ausgezählte EGFP-positive Zellen in zwei zufällig gewählten Gesichtsfeldern, x100). Diese Prozentbereiche gelten sowohl für die Kokultur mit Knochenmarkgemisch, d. h. ohne Auftrennung nach der Expression von Sca-1, als auch für die Kokultur mit einer der beiden Zellfraktionen (Sca-1-positiv und Sca-1-negativ). Nach immunhistochemischer Anfärbung des für Makrophagen und Mikrogliazellen spezifischen Iba-1-Antigens (Imai 1996, Ito 1998) zeigten alle ramifizierten Zellen eine Kolokalisation von EGFP und Iba-1-Texas Red bzw. -Cy-3 (Abb. 18, 20, 21, 22, 23, 24). Der größere Teil der EGFP-exprimierenden Zellen war zu den unterschiedlichen Zeitpunkten von runder oder spindelartiger Form mit bipolaren, z. T. sehr langen



Zellfortsätze. Bei einer großen, aber nicht weiter quantifizierten Fraktion der spindelförmigen Zellen fand sich ebenfalls Immunoreaktivität für Iba-1. Morphologie und Immunhistochemie sprechen dafür, dass es sich hierbei um adhätierende monozytäre Zellen handelte. Bei der Kultur von Knochenmark aus transgenen Donortieren, die GFP unter der Kontrolle des  $\beta$ -Actin-Promoters exprimieren, auf astrozytären *Monolayers* ergaben sich in der Aussage identische Ergebnisse. Ramifizierte Zellen mit GFP-Expression fanden sich in ähnlicher Anzahl allerdings erst ab dem 12. Tag in Kultur (17 von 100 gezählten Zellen), entsprachen in ihrer Morphologie aber den o. g. Mikroglia-ähnlichen Zellen. Wiederum zeigte ein Großteil dieser Zellen Kolokalisation von GFP mit dem Iba-1-Signal (Abb. 25,26).

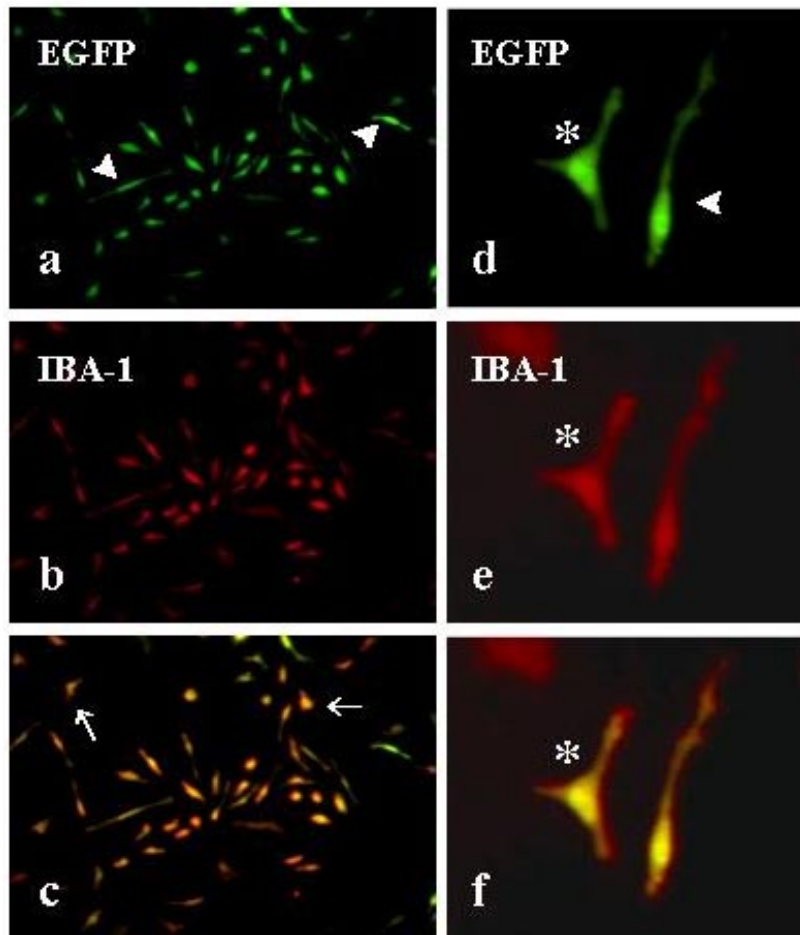


Abbildung 17:

Kultur von transfizierten, *Sca-1*-negativen Knochenmarkszellen auf Mausastrozyten. Tag 3 der Kokultur. Die überwiegende Mehrheit der bei Aussaat sphärischen Knochenmarkszellen hat sich entrundet. Einige Zellen haben bipolare, z. T. bereits sehr lange Zytoplasmafortsätze ausgebildet und zeigen eine spindelartige Form (Pfeilspitzen in **a** und **d**). In Zusammenschau mit ihrer Immunoreaktivität für *Iba-1* (**b**, **e**) handelt es sich am ehesten um reifere monozytäre Zellen, die auch auf azellulären Substraten eine solche Morphologie annehmen. Andere Zellen, ebenfalls positiv für *Iba-1* und GFP, besitzen plumpere Zelleiber und Fortsätze (Pfeile in **c**) oder weisen mehr als zwei Pseudopodien auf (Stern in **d** - **f**). Vergrößerung x100 (**a** - **c**), x400 (**d** - **f**).

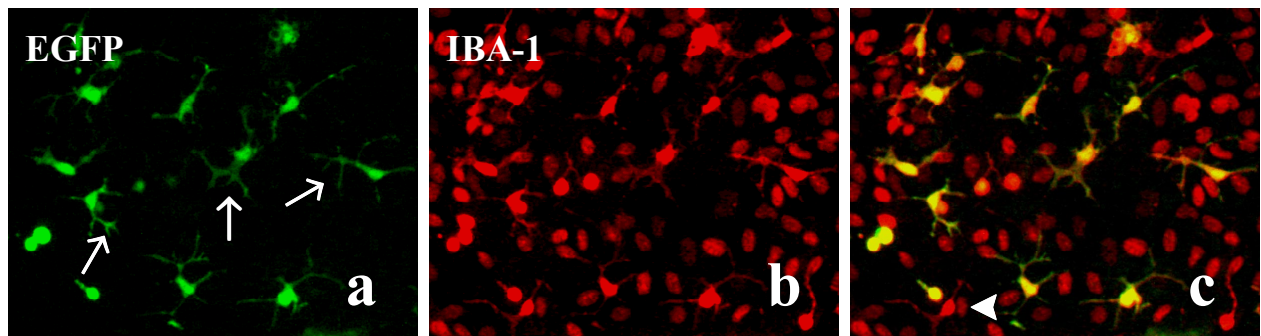


Abbildung 18:

Kultur von transfizierten, *Sca-1*-negativen Knochenmarkszellen auf Mausastrozyten. Tag 6 der Kokultur. Zahlreiche GFP-positive Zellen weisen primäre und sekundäre Ramifikationen auf (Pfeile in **a**, x200). Jede dieser Zellen ist immunoreaktiv für *Iba-1* (**b**) und zeigt eine klare Kolokalisation beider Fluoreszenzsignale (**c**). Eine ramifizierte Zelle (Pfeilspitze in **c**) exprimiert zwar *Iba-1*, nicht aber GFP. Sie leitet sich entweder von kontaminierenden Mikrogliazellen aus der primären Astrozytenkultur oder von nicht transfizierten Knochenmarkszellen her.

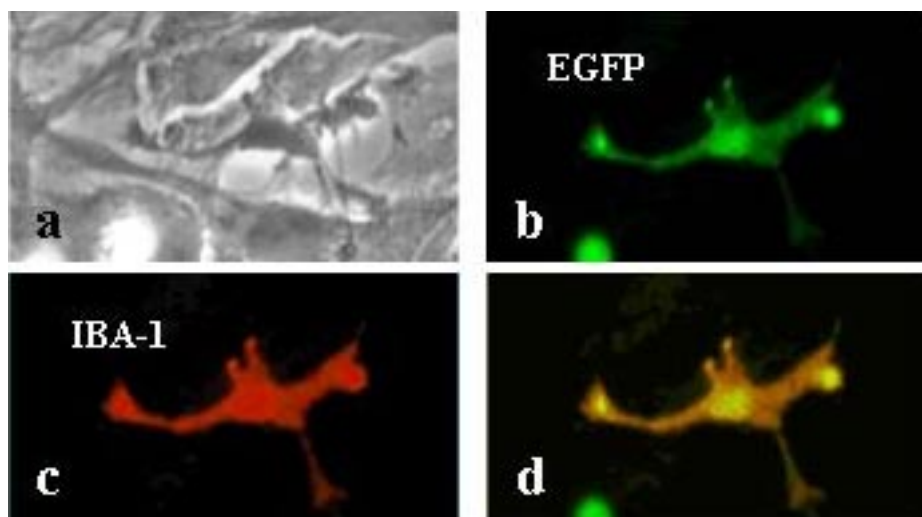


Abbildung 19:

Kultur von transfizierten, *Sca-1*-negativen Knochenmarkszellen auf Mausastrozyten (x400), Tag 6. Die abgebildete Zelle besitzt einen entrundeten Zelleib und mehrere Fortsätze, die sich noch nicht weiter aufgezweigt haben. (**a**) Durchlicht, (**b**) EGFP, (**c**) *Iba-1*, (**d**) Überlagerung.

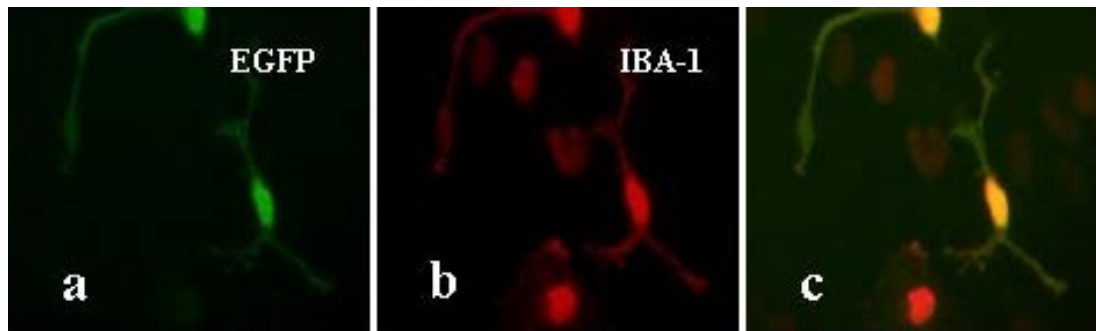


Abbildung 20: Kultur transfizierter, Sca-1-positiver Knochenmarkzellen auf Astrozyten. Tag 12 der Kokultur. (a) GFP, (b) Iba-1, (c) Überlagerung. Die rechts unten zu erkennende Zelle weist langgestreckte Zytoplasmafortsätze mit kurzen sekundären Verzweigungen auf. Vergr. x400.

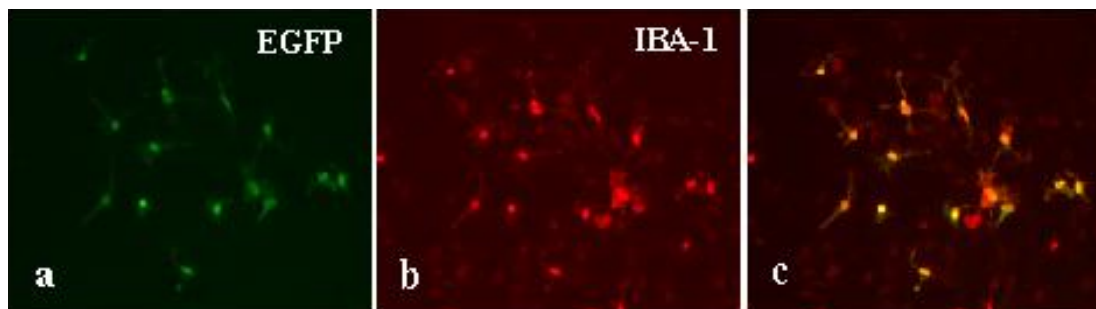


Abbildung 21: Kultur transfizierter, Sca-1-positiver Knochenmarkzellen auf Astrozyten. Tag 18 der Kokultur. (a) GFP, (b) Iba-1, (c) Überlagerung. Vergrößerung x200.

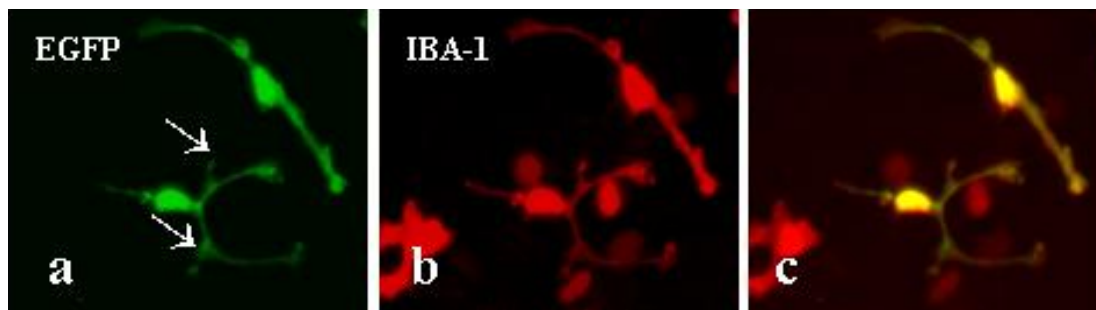


Abbildung 22: Kultur transfizierter Sca-1-positiver Knochenmarkzellen auf Mauseastrozyten. Tag 18 der Kokultur. Die in den Teilabbildungen unten dargestellte Zelle besitzt Primär- und Sekundärfortsätze (Pfeile in a). Nach dieser längeren Kulturphase erscheinen die Fluoreszenzsignale von GFP und Iba-1 perinukleär verstärkt und in den Zellfortsätzen deutlich abgeschwächt. Dieses Phänomen konnte in allen Experimenten beobachtet werden. (a) EGFP, (b) Iba-1, (c) Überlagerung. Vergrößerung x400.

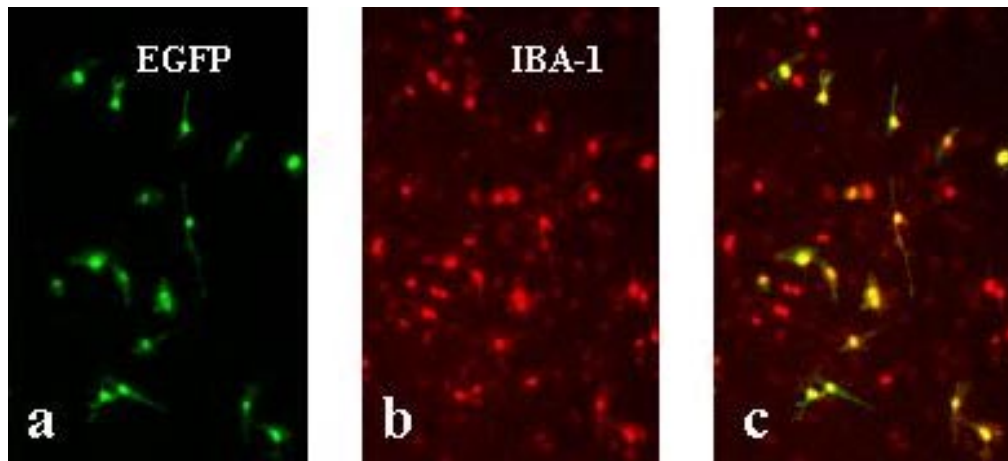


Abbildung 23: Kultur transfizierter, *Sca-1*-positiver Knochenmarkzellen auf Astrozyten. Tag 18 der Kokultur. (a) GFP, (b) Iba-1, (c) Überlagerung. Vergrößerung  $\times 100$ . Die abgebildeten Zellen zeigen eine irreguläre Morphologie mit langgestreckten, z. T. spindelförmigen Zytoplasmafortsätzen ohne weitere Ramifikation.

Wurden GFP-transfizierte oder  $\beta$ -Actin/GFP-transgene Knochenmarkzellen auf einem azellulären Substrat - d. h. in unserem Fall auf Polycarbonat – in konditioniertem Astrozytenmedium kultiviert, fanden sich keine über das Stadium der Primärfortsätze hinausgehenden Ramifikationserscheinungen; die Zellen zeigten bis zum Abbruch der Kultur ausschließlich runde, amöboide oder spindelförmige Morphologien. Insgesamt nahm die Zahl der Zellen während der Kultur auf Polycarbonat progredient ab, was eine Bedeutung der direkten Zellinteraktion auch für das bloße Überleben der Knochenmarkzellen nahelegt. Der oben bereits erwähnte deutliche Größenunterschied zwischen Knochenmarkzellen einerseits und darunter liegenden Astrozyten andererseits blieb bis zum Ende der Kokulturphase bestehen und zu keinem Zeitpunkt fanden sich GFP-positive Zellen, die das flächenhafte Ausbreitungsmuster protoplasmatischer oder das typische Wachstumsbild fibrillärer Astrozyten zeigten. Nach erfolgter Visualisierung des GFAP-Antigens fand sich keinerlei Kolo-kalisation von GFP und rotem Fluoreszenzsignal (GFAP, Abb. 26). Aufgrund der unterschiedlichen Größe beider Zelltypen erschien es notwendig auszuschließen, dass die etwaige Immunoreaktivität von Knochenmarkzellen für GFAP im ausgedehnten GFAP-Signal des Astrozyten-Monolayers „unterging“ bzw. davon überstrahlt wurde. Daher wurden im Rahmen zweier Experimente die Zellen in ausgewählten *wells* vor der Fixierung mit Trypsin--

Lösung mobilisiert und mittels Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht. Nach Fixierung und GFAP-Färbung war es nun möglich, auf der Einzelzelebene nach Kolokalisationen zu suchen. Pro Versuchszeitpunkt wurden 300 GFP-positive Zellen auf eine Kolokalisation mit dem GFAP-Signal hin überprüft (insgesamt also 1500 Zellen bei jedem Experiment), die bei keiner einzigen Zelle vorlag.

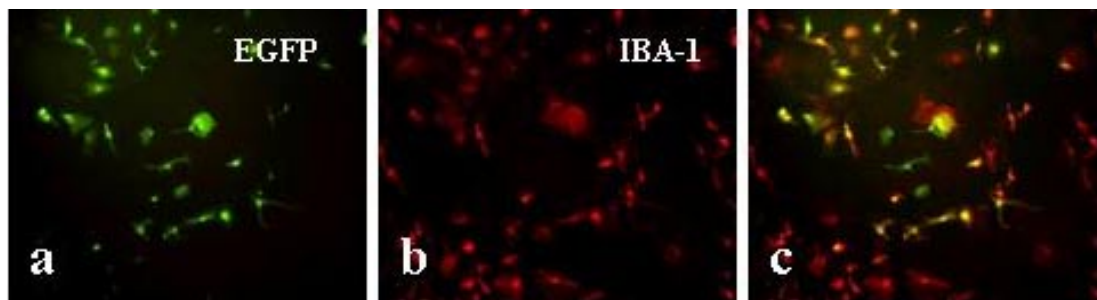


Abbildung 24:

Kultur Sca-1-positiver Knochenmarkzellen aus einer  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen Donormaus auf Astrozyten. Tag 12 der Kokultur. (a) GFP, (b) Iba-1, (c) Überlagerung. Vergrößerung x100. Nicht anders als in der Kokultur transfizierter Zellen haben zahlreiche Zellen eine ramifizierte Morphologie angenommen und koexprimieren GFP und Iba1. Das GFP-Signal der  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen Zellen ist nach 12 Tagen in vitro noch ebenso intensiv wie im Gehirn des Donortiers unmittelbar nach der Perfusion mit PFA (vgl. Abb. 15). Teilabbildung c zeigt in der Bildmitte 3 untereinander liegende Zellen (eine davon mit Primär- und Sekundärfortsätzen), die Iba-1-negativ sind.



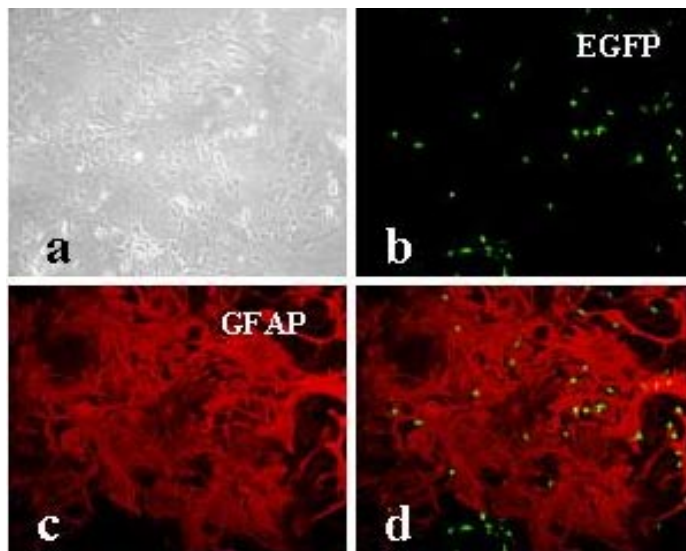


Abbildung 25:

Kultur transfizierter, *Sca-1*-negativer Knochenmarkzellen auf Astrozyten. Tag 3 der Kokultur. (a) Durchlicht, (b) GFP, (c) GFAP, (d) Überlagerung. Deutlich ist der enorme Größenunterschied zwischen den GFP-positiven Zellen und den darunterliegende Astrozyten. Zu diesem frühen Zeitpunkt der Kokultur haben fast alle Knochenmarkzellen noch eine amöboide Form. Zelluläre Kolokalisation von GFP und GFAP ist nicht erkennbar. Vergrößerung x100.

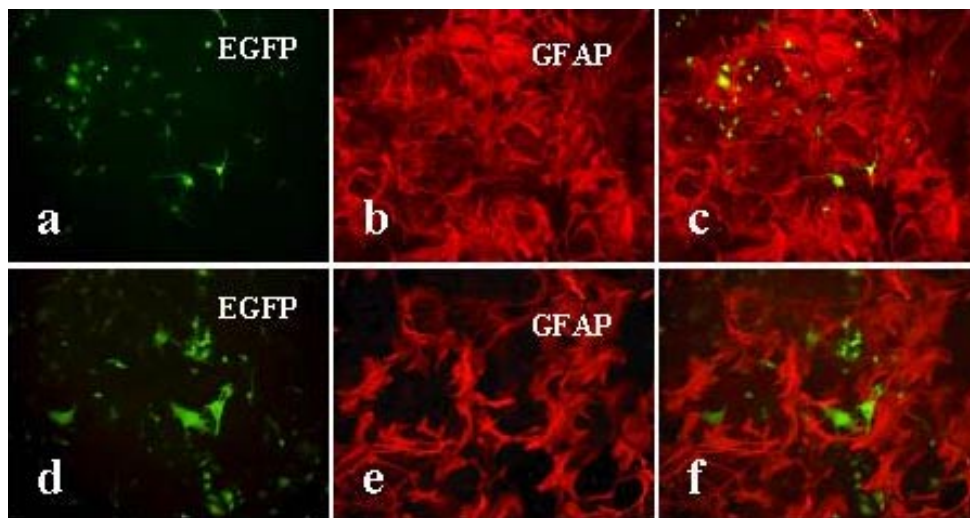


Abbildung 26: a – c: Kultur transfizierter, *Sca-1*-neg. Knochenmarkzellen auf Astrozyten, Tag 6 der Kokultur. d – e: Kultur transfizierter, *Sca-1*-pos. Knochenmarkzellen auf Astrozyten, Tag 12 der Kokultur (x200). Der Größenunterschied zwischen Knochenmarkzellen einerseits (a) und GFAP-positiven Astrozyten andererseits (b) bleibt deutlich. Zelluläre Kolokalisationen beider Fluoreszenzsignale sind nicht erkennbar (c). Das mehr flächen-hafte GFAP--Signal bildet den Hintergrund einiger GFP-positiver Zellen, so dass diese nach Überlagerung z. T. gelb erscheinen (c). Um diesen Artefakt zu umgehen, wurden zusätzlich Einzelzellanalysen an zytozentrifugierten Kokulturen durchgeführt (s. Text). Vergrößerung x100.

Wurden Knochenmarkzellen aus  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen Mäusen auf murinen Astrozyten kultiviert, ergaben sich keine Hinweise auf eine astrozytäre Differenzierung der Knochenmarkzellen: Zu keinem der gewählten Zeitpunkte erfüllten GFP-positive Zellen die dazu als erforderlich gesetzten Kriterien der typischen Morphologie und der Immunoreaktivität für GFAP. In der Kokultur von Knochenmark aus GFAP/GFP-transgenen Mäusen, bei denen GFP ausschließlich in Astrozyten synthetisiert wird, konnte zu keinem Versuchszeitpunkt ein GFP-Signal detektiert werden.

### **5.2.3 Differenzierung von Knochenmarkzellen in Kultur auf OEHS**

Um die mögliche Ausweitung des Differenzierungsspektrums hämatogener Zellen durch ein annähernd organotypisches Mikromilieu auszutesten, wurde Knochenmark auf vitalen Hirnschnitten (*OEHS*) kultiviert. Die GFP-transfizierten Knochenmarkzellen waren im Vorfeld entsprechend der Expression von Sca-1 selektioniert worden, um Sca-1-positive Stammzellen anzureichern und ihr Differenzierungsverhalten gesondert zu untersuchen. Die Dauer der Kokultur wurde auf maximal 8 Tage begrenzt, da die Schnittkulturen zuvor bereits eine Woche *in vitro* gehalten worden waren und sowohl der organotypische Charakter als auch die mechanische Integrität der *Slices* durch eine langsam zunehmende Astroglieose beeinträchtigt wurden. Die Dicke des Hirnschnittes nahm von 300  $\mu\text{m}$  nach Präparation auf ca. 130-150  $\mu\text{m}$  zum Ende der Kulturphase ab. Zu jedem der drei Zeitpunkte (3, 5 und 8 Tage *in vitro*) wurden 4 bis 6 OEHS mit Knochenmark versehen. Jeder Hirnschnitt wurde so mit Knochenmarkzellen beimpft, dass die applizierte Zellsuspension (5  $\mu\text{l}$ ) als Tropfen über dem Gewebe stand und möglichst nicht über dessen Rand hinwegfloss. Es wurden 4 Experimente mit transfiziertem Knochenmark und 1 Experiment mit Zellen aus der GFP- $\beta$ -Actin-transgenen Maus durchgeführt. Die folgenden Ausführungen gelten für beide Versuchsansätze. Mittels Fluoreszenzmikroskopie der vitalen Kokultur



konnte gezeigt werden, dass die GFP-positiven Zellen stark proliferierten (Abb. 29 d und e) und teilweise in die Tiefe des Hirnschnittes einwanderten; die betreffenden Zellen wiesen deshalb eine technisch bedingte Konturunschärfe auf (Abb. 27 d und e, 28 b und c). Die Migration der Knochenmarkzellen konnte später am fixierten und geschnittenen Slice ebenfalls nachvollzogen werden, da GFP-positive Zellen in unterschiedlichen Schnittebenen nachweisbar waren. Bereits vor dem Ende der Kokultur konnte im lebenden Hirnschnitt die fortschreitende Ramifikation von Knochenmarkzellen beobachtet werden (Abb. 28 c, 29 f).

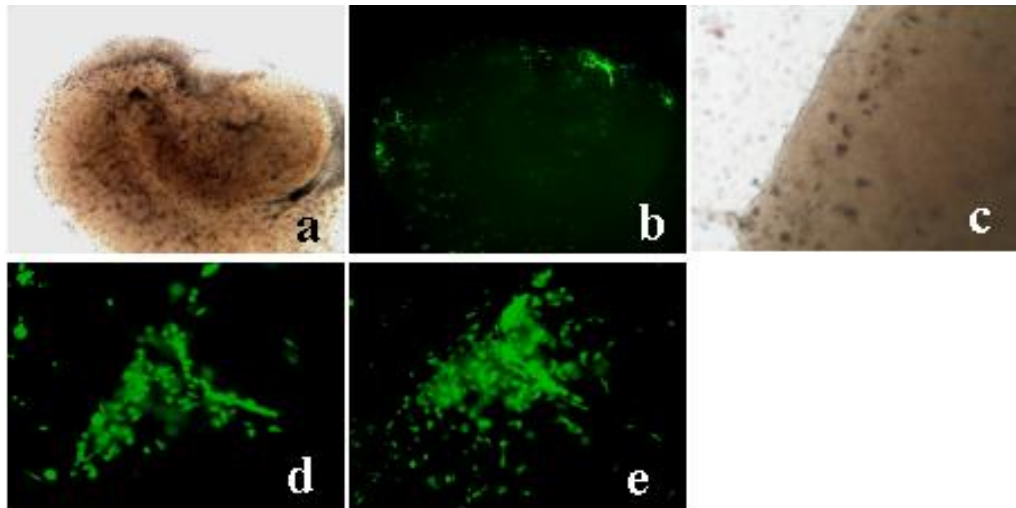


Abbildung 27: Kultur transfizierter, Sca-1-negativer Knochenmarkzellen auf OEHSC. Wegen der konvexen Schnitt-  
oberfläche haben sich die meisten EGFP-positiven Knochenmarkzellen in den Randbereichen angesammelt (a und  
b, Tag 3 der Kokultur, x50). Die Teilabbildungen c – e zeigen alle den gleichen Ausschnitt und dokumentieren die  
Proliferationsfähigkeit der EGFP-markierten Knochenmarkzellen auf dem Slice. (b) Tag 3 der Kokultur, (c) und (d)  
Tag 3 der Kokultur, (e) Tag 5 der Kokultur. Vergrößerung x200.

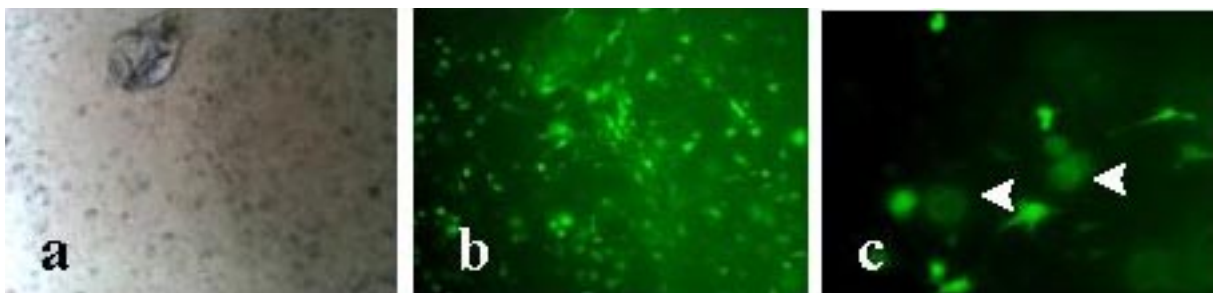
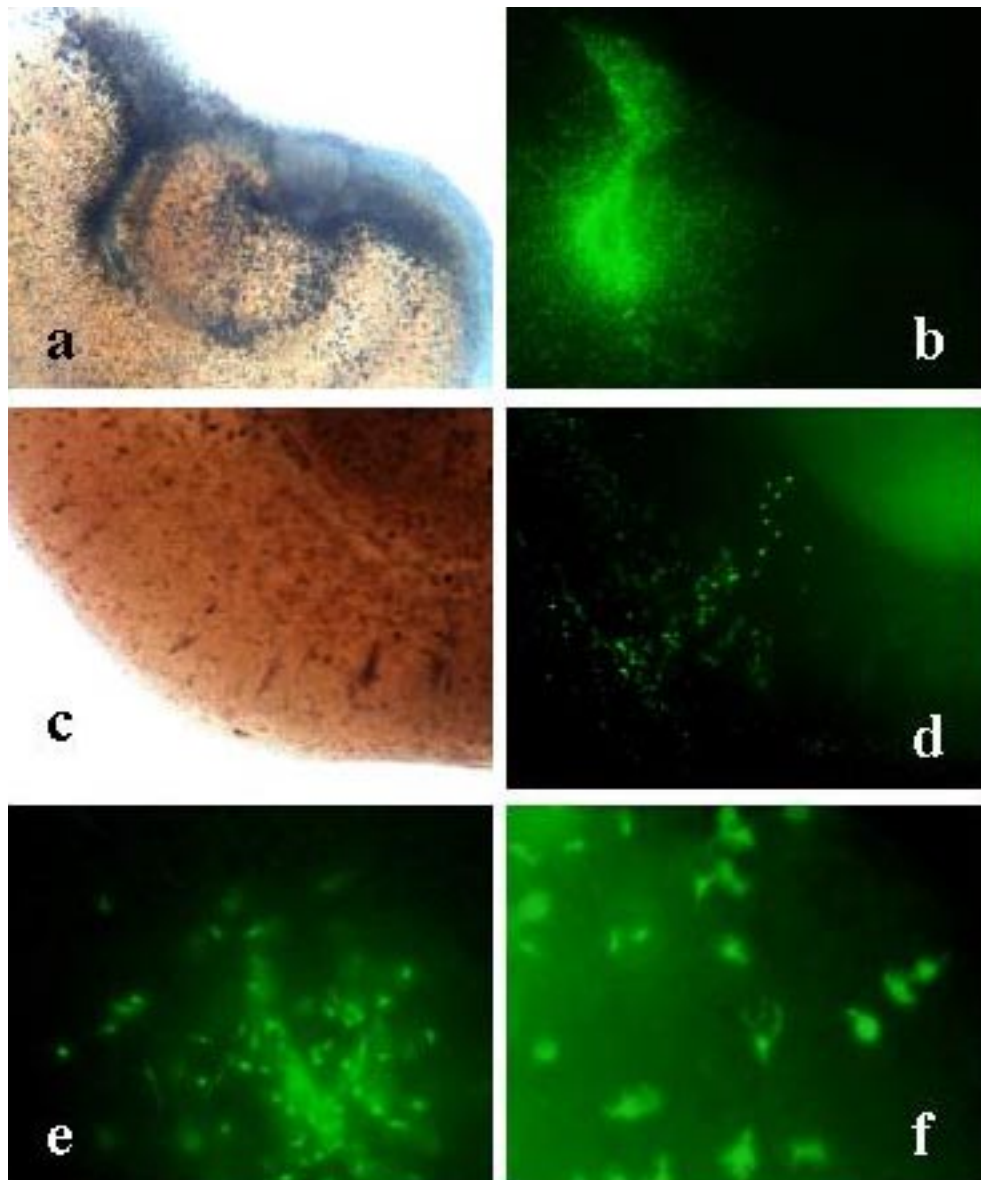


Abbildung 28: Kultur transfizierter, Sca-1-negativer Knochenmarkzellen auf OEHSC. Tag 5 der Kokultur, vor der  
Fixierung. Das Gewebe wird im Durchlicht (a) von außen nach innen dunkler, während im blauen Licht (b) die  
Autofluoreszenz in derselben Richtung zunimmt (a und b zeigen denselben Ausschnitt). Beides wird durch die zum  
Rand hin abnehmende Dicke des Präparates verursacht. Die GFP-positiven Zellen in b und c wirken teilweise un-  
scharf, was ihre Einwanderung in tiefere Gewebeschichten widerspiegelt (Pfeilspitzen in c). Die Zahl der Knochen-  
markzellen hat im Vergleich zum ersten Tag der Kokultur stark zugenommen (b). Die Zellen weisen z. T.  
Zellfortsätze auf (c). Vergrößerung x200 (a, b), x400 (c).



*Abbildung 29:*

*Kultur transfizierter, Sca-1-positiver Knochenmarkzellen auf OEHSC. Tag 8. Alle Aufnahmen stammen von vitalen Präparaten. Die Knochenmarkzellen haben massiv proliferiert und konzentrieren sich auf die Furche zwischen Hippocampus und entorhinalem Cortex (a, b, x50). Vertikal zum Schnitttrand bilden sie eine Straße im kortikalen Gewebe (c, d, x100). Bei stärkerer Vergrößerung sind diverse, u. a. ramifizierte Zellmorphologien sichtbar (e, x 200 und f, x400). Schärfenunterschiede zwischen den Zellen sind durch ihre Migration in die Tiefe des Gewebes bedingt.*

Die nach Fixierung angefertigten Kryoschnitte wurden einer immunhistochemischen Färbung der Antigene Iba-1 (Abb. 30) und GFAP unterzogen. Danach erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung. GFP-markierte Zellen hatten bereits am 3. Tag der Kokultur feine Zellfortsätze ausgebildet (Abb. 31), die sich bis zum 5. Tag weiter verzweigten (Abb. 32-34) und am Tag 8 in weitgehend unveränderter Form zu finden waren (Abb. 35-40). Alle ramifizierten GFP-positiven Zellen erwiesen sich als immunoreaktiv für den Makrophagen-Marker Iba-1 und lagen meistens in Gruppen von 2 bis 10 Zellen zusammen. Eine Präferenz dieser Zellcluster für bestimmte Regionen des entorhinal-hippocampalen Gewebeschnittes war nicht offensichtlich; allerdings schienen sich die Knochenmarkzellen in einigen Präparaten den vorgegebenen anatomischen Strukturen entsprechend angeordnet zu haben (Abb. 33). Die am 8. Tag fixierten Sliceulturen zeigten eine größere Dichte ramifizierter Mikroglia, was das Abklingen lokaler inflammatorischer Vorgänge reflektieren könnte. Zu allen Zeitpunkten der Kokultur auf OEHSC zeigten die applizierten Knochenmarkzellen keine makrogliale Differenzierung, wie sie bei GFP-markierten Knochenmarkzellen durch Kolo-kalisation mit GFAP und bei GFAP/GFP-transgenen Knochenmarkzellen durch Expression von GFP kenntlich wäre (Abb. 41).

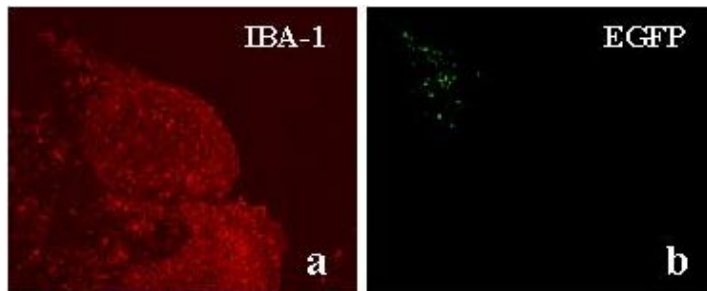


Abbildung 30:

Kultur transfizierter, *Sca-1*-negativer Knochenmarkzellen auf OEHSC, Tag 3 der Kokultur. Der organotypische Hirnschnitt ist nach der Mikrogliafärbung mit *Iba-1*-positiven Zellen übersät (**a**). Teilabbildung **b** zeigt den gleichen Ausschnitt im blauen Fluoreszenzlicht; im linken oberen Teil ist ein Haufen GFP-exprimierender Zellen zu sehen. Vergrößerung x50.

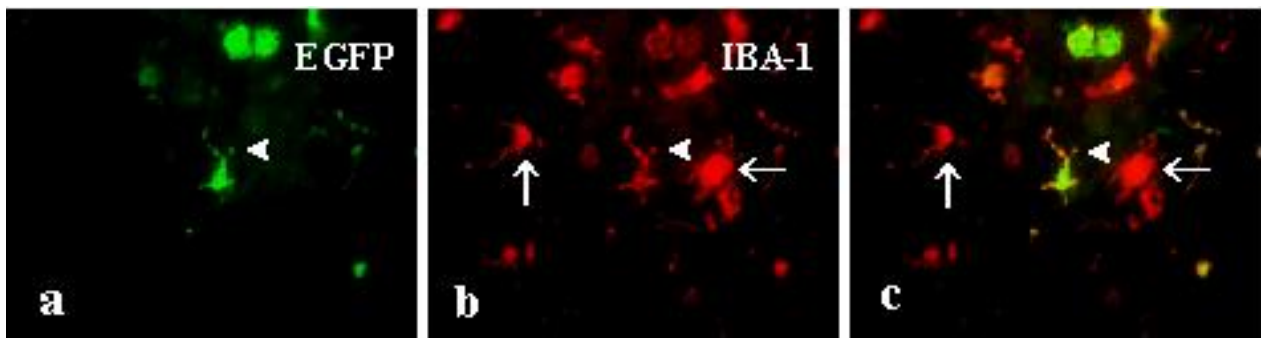


Abbildung 31:

Kultur transfizierter, *Sca-1*-negativer Knochenmarkzellen auf OEHSC, Tag 3. Die Zelle in der Bildmitte besitzt einen Sekundärfortsatz (Pfeilspitze) und weist ein deutliches *Iba-1*-Signal auf (**b**), das mit GFP kolokalisiert (**c**). In **b** und **c** sind Zellen zu sehen, die zwar *Iba-1*, nicht aber GFP exprimieren (Pfeile). Am ehesten handelt es sich dabei um intrinsische Mikroglia aus der Hirnschnitt-Kultur. Vergrößerung x250.

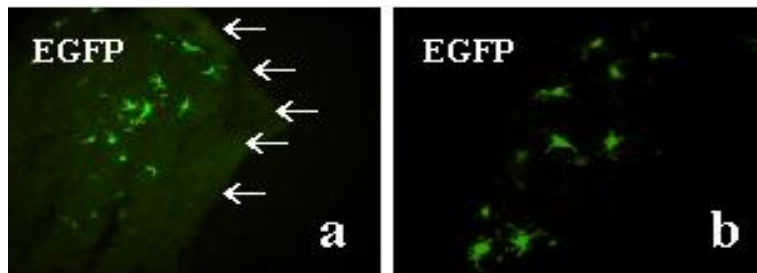


Abbildung 32:

Kultur Sca-1-negativer Knochenmarkszellen auf OEHS. Tag 5 der Kokultur. Auf beiden Teilabbildungen sind zahlreiche ramifizierte GFP-positive Zellen zu sehen. Pfeile in **a**: Präparatrand. Vergr. x100 (**a**), x200 (**b**).

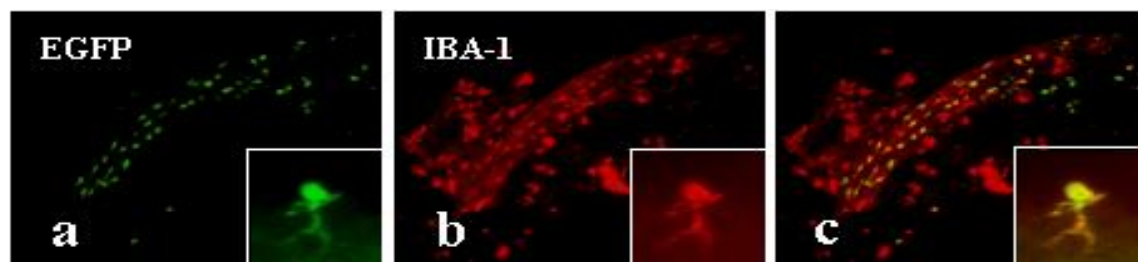


Abbildung 33:

Kultur Sca-1-positiver Knochenmarkszellen auf OEHS. Tag 5 der Kokultur. Man erkennt GFP-positive Knochenmarkszellen entlang der Cortex-Hippocampus-Grenze (**a - c**). Der überwiegende Teil dieser Zellen kolokalisiert mit Iba-1 (**c**) und besitzt eine bipolare Form mit schmalen Zytoplasmafortsätzen (Pfeile). Der hohe Ordnungsgrad der applizierten Knochenmarkszellen deutet auf ihre Integration in die lokalen Strukturen hin und lässt vermuten, dass sie mit ihrer Umgebung in Wechselwirkung stehen. Die **Einschübe in a - c** zeigen eine Zelle mit unipolar ansetzenden Ramifikationen. Vergrößerung x100, x400.

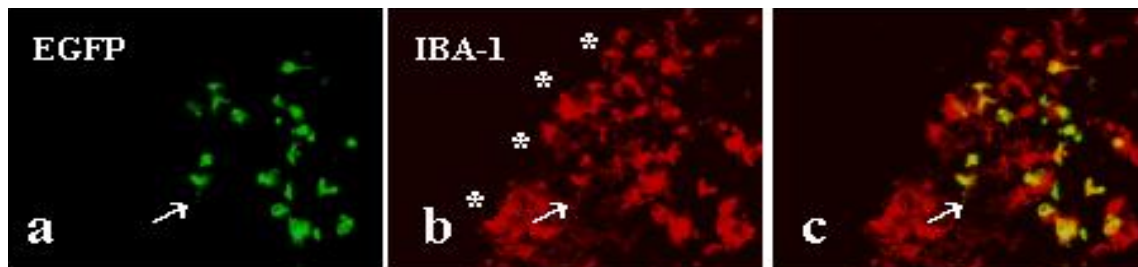


Abbildung 34:

Kultur Sca-1-neg. Knochenmarkszellen aus einem  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen Donortier auf OEHS. Tag 5 der Kokultur. Die konstitutive GFP-Expression in den Knochenmarkszellen ist mit einem ebenso intensiven Fluoreszenzsignal verbunden wie bei GFP-transfiziertem Knochenmark (**a**). In einem Cluster von etwa 20 Zellen zeigen die meisten eine Kolokalisation von GFP und Iba-1 (**c**); einige weisen feine Ramifikationen auf (Pfeile in **a - c**). Der Rand des Hirnschnittes ist durch Sterne gekennzeichnet (**b**). Vergrößerung x200.

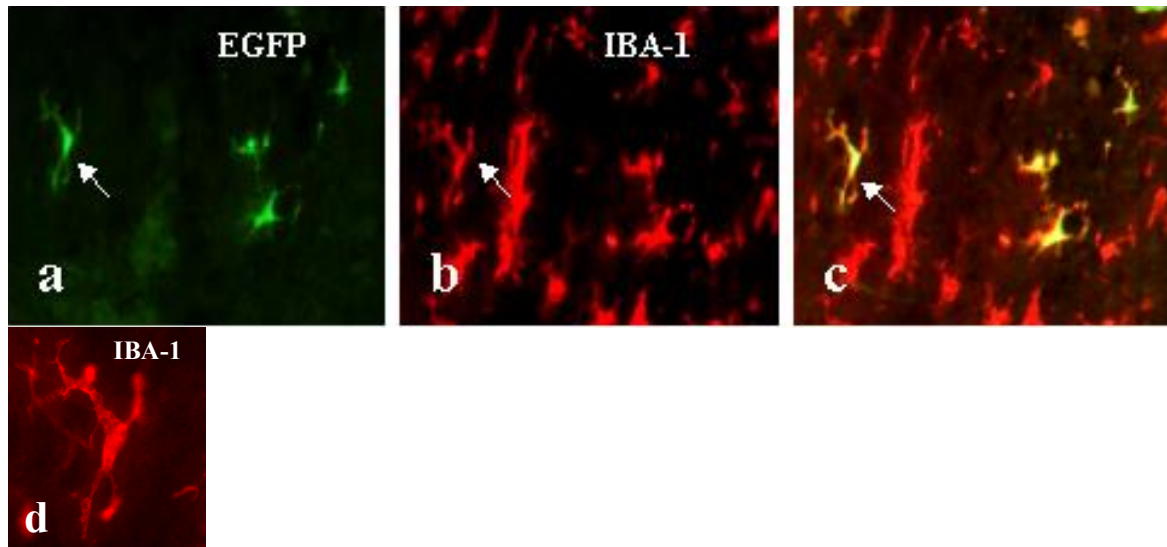


Abbildung 35:

Kultur von transfizierten, *Sca-1*-negativen Knochenmarkszellen auf OEHSK. Tag 8 der Kokultur. Es finden sich zahlreiche GFP-positive Zellen mit primären und sekundären Ramifikationen, die Immunoreaktivität für *Iba-1* aufweisen (a – c, Vergrößerung x 200). Teilabbildung d zeigt die in a – c mit einem Pfeil markierte *Iba-1*-positive Zelle in 400-facher Vergrößerung; die haarfeinen Zellfortsätze sind gut zu erkennen.

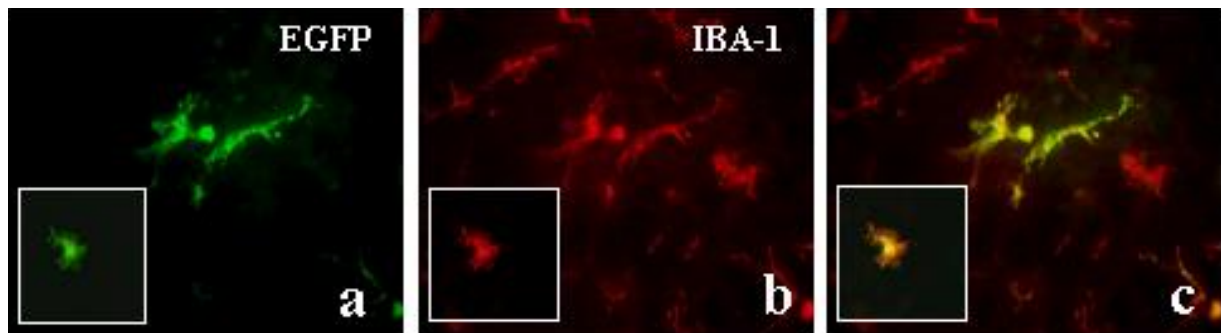


Abbildung 36:

Kultur transfizierter, *Sca-1*-negativer Knochenmarkszellen auf OEHSK. Tag 8 der Kokultur. Die Bildreihen a – c inklusive der Einschübe zeigen ramifizierte Zellen mit Zytoplasmafortsätzen, in denen EGFP und *Iba-1* weniger intensiv zur Darstellung kommen als im Zelleib und im Bereich des Zellkerns. Dennoch läßt sich die Kolo-kalisation beider Signale durch Übereinanderlagerung der Einzelbilder nachweisen. Vergrößerung x400.



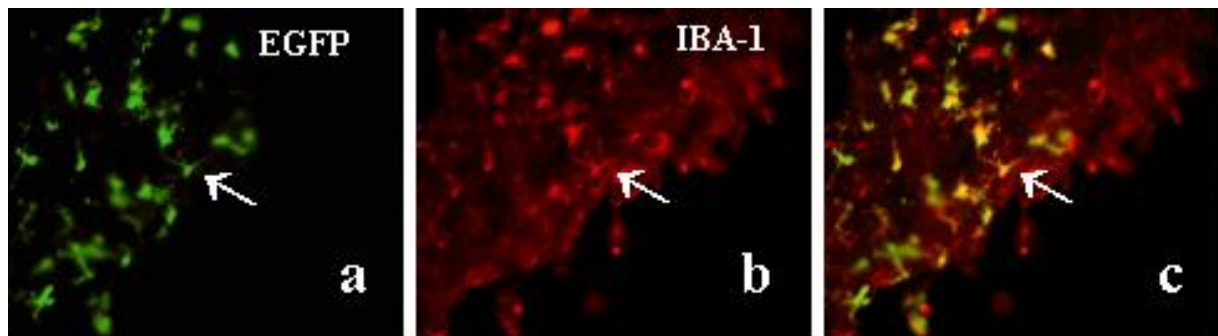


Abbildung 37:

Kultur von transfizierten, *Sca-1*-positiven Knochenmarkzellen auf OEHSC. Tag 8 der Kokultur. Auch hier finden sich ramifizierte Zellen mit der Morphologie ruhender Mikroglia, die ein Doppelsignal aus GFP und Iba-1 (Texas Red) aufweisen (Pfeil). Vergrößerung x100.



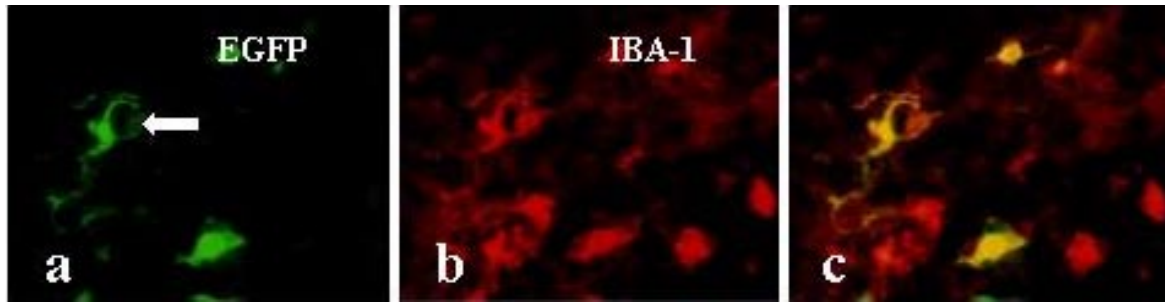


Abbildung 38: Kultur Sca-1-positiver Knochenmarkzellen aus einem  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen Donortier auf OEHS. Tag 8 der Kokultur. Die mit einem Stern markierte Zelle weist feine Ramifikationen auf, die durch das zytosolisch lokalisierte GFP erkennbar sind. GFP kolokalisiert mit dem Mikroglia-Marker Iba-1. Die Intensität des GFP, dessen Expression an die von  $\beta$ -Actin gekoppelt ist, hat im weiteren Verlauf der Kokultur nicht nachgelassen. Vergrößerung x200.

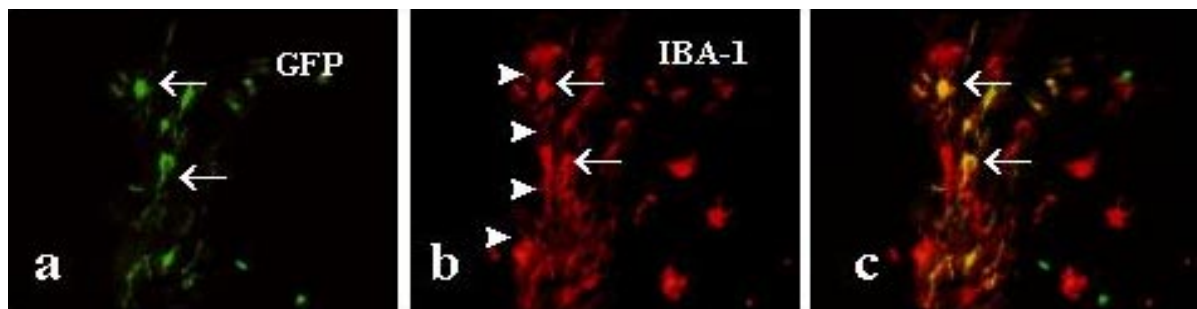


Abbildung 39: Kultur von Knochenmark aus einem  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen Donortier auf OEHS. Tag 8 der Kokultur. Nahe dem Rand des Hirnschnittes (Pfeilspitzen in b) sieht man zwei Mikroglia-ähnliche Zellen, die GFP und Iba-1 koexprimieren (Pfeile in a - c). Vergrößerung x200.

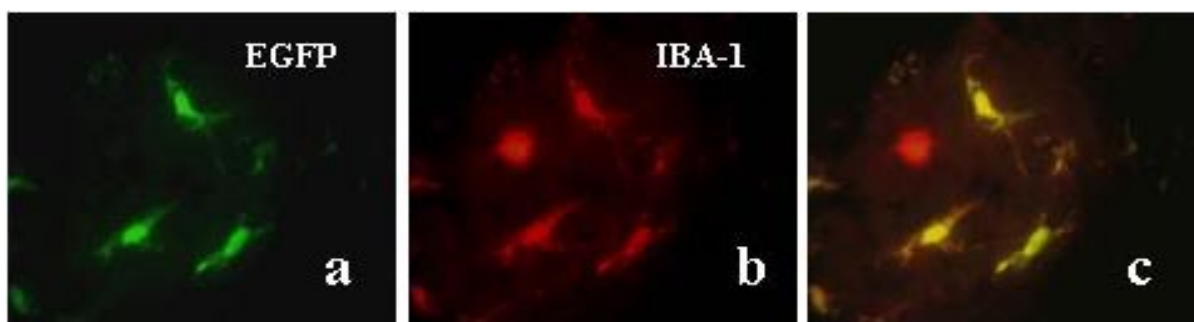
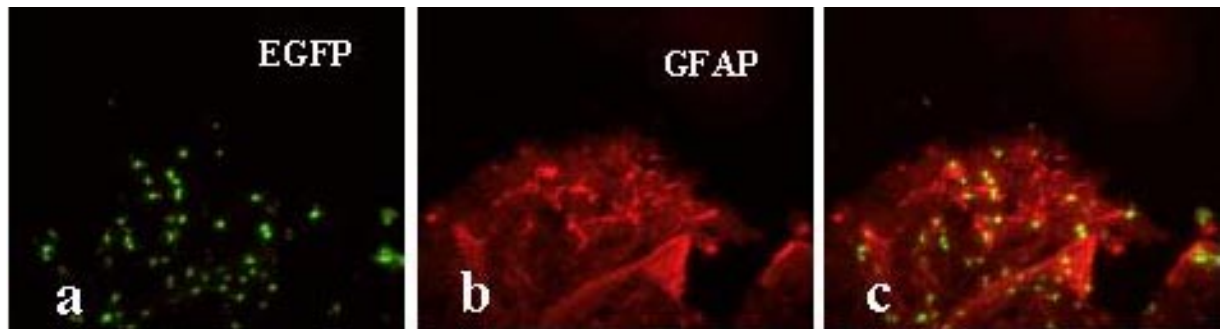


Abbildung 40: Kultur von Knochenmark aus einer  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen Donormaus. Tag 8 der Kokultur. Die drei abgebildeten Zellen mit (peri)nukleär akzentuiertem GFP-Signal haben lange Zellausläufer ausgebildet und exprimieren das mikrogliale Antigen Iba-1. Vergrößerung x400.



*Abbildung 41: Kultur transfizierter, Sca-1-positiver Knochenmarkzellen auf OEHSC. Tag 5 der Kokultur. Wie auch in sämtlichen anderen Kokultorexperimenten auf organotypischen Hirnschnitten findet sich hier keine zelluläre Kolokalisation des EGFP-Signals mit GFAP. Die Knochenmarkzellen sind erheblich kleiner als die z. T. nur noch eingeschränkt anfärbbaren Astrozyten innerhalb des Hirnschnittes. Vergrößerung x100.*

## 6 Diskussion

Ziel der in dieser Arbeit vorgestellten Versuche war es zu untersuchen, ob adulte murine Knochenmarkzellen unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Fähigkeit zur Differenzierung in GFAP-positive Astrozyten besitzen. Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse lassen für die hier gewählten experimentellen Bedingungen eine eindeutig negative Antwort auf diese Frage zu, da in keinem der durchgeführten Versuche eine Expression von GFAP durch Knochenmarkzellen oder ihre Abkömmlinge gezeigt werden konnte. Im Hinblick darauf, dass seit 1997 mehrere Arbeiten publiziert worden sind, deren Kernaussage im Widerspruch zu unserem Resultat steht, soll im folgenden auf Fragen der methodischen Vergleichbarkeit sowie auf mögliche Gründe für diese Diskrepanz eingegangen werden.

### 1.

Die durchgeführten Tierexperimente basierten auf dem Modell einer transgenen Maus, die GFP unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promoters exprimiert (Nolte 2001). Aufgrund der Tatsache, dass GFAP im Zentralnervensystem mit hoher Spezifität von Astrozyten exprimiert wird, kann bei diesen transgenen Tieren von einer konstitutiven GFP-Expression ausschließlich durch astrozytäre Zellen ausgegangen werden. Dieser Sachverhalt wird in zahlreichen anderen transgenen Mausmodellen ausgenutzt, bei denen das jeweilige Reportergen durch den humanen Promoter für GFAP kontrolliert wird (Brenner 1994, Brenner und Messing 1996, Holland und Varmus 1998). Die Verwendbarkeit des GFP-Gens als Teil eines transgenen Konstrukts wurde u. a. von Fuss et al. gezeigt, die das Gen einer GFP-Variante unter der Kontrolle des Proteolipid-Protein-Promoters in ausgereiften Oligodendrozyten zur Expression bringen konnten (Fuss 2000). Nahezu ubiquitäre Expression von GFP weist die  $\beta$ -Actin/GFP-transgene Maus auf, die von Okabe et

al. entwickelt wurde und als Knochenmarksdonor für einen Teil der von uns durchgeführten Zellkulturexperimente fungierte (Okabe 1997, Kawakami 1999). Ein transgenes Modell, bei dem GFP-S65T ebenfalls unter die Kontrolle des humanen GFAP-Promoters gestellt ist, wurde von Zhuo et al. beschrieben (Zhuo 1997). Der Vorteil der spezifischen Expression von GFP in Astrozyten besteht zum einen in der Möglichkeit, die Zellen z. B. in vitalen Schnittpräparaten direkt zu identifizieren und sie morphologisch oder elektrophysiologisch zu studieren. Zum anderen liegen sowohl GFAP als auch GFP in Astrozyten cytoplasmatisch vor, so dass zelluläre Kollokationen eindeutig festzustellen sind. Nur auf der subzellulären Ebene zeigen die beiden Fluoreszenzsignale keine vollständige Kongruenz, was damit erklärt werden kann, dass GFAP als Cytoskelettprotein nicht bis in die feinsten Zellfortsätze hinein vorhanden ist, während GFP frei im Cytoplasma vorliegt und auch filigrane Strukturen kontrastiert (Nolte 2001). Zahlreiche *in vitro*-Arbeiten haben gezeigt, dass der Transfer des GFP-Gens in verschiedenste Säugerzellen keine schädigenden Effekte auf Morphologie, Funktion und Proliferation nach sich zieht (Cheng 1996); das GFP-Signal hat sich zudem in transfizierten oder transgenen Zellen über lange Zeiträume als stabil erwiesen und wird nicht nach extrazellulär abgegeben. Auch die ubiquitäre oder auf spezifische Zelltypen beschränkte Expression von GFP in transgenen Mäusen hat bisher keine negativen Auswirkungen auf Wachstum und Fortpflanzung der Tiere gezeigt (Zhuo 1997, Okabe 1998, Fuss 2000, Nolte 2001). Im Rahmen der vorgestellten Arbeit wurde Knochenmark aus adulten GFAP/GFP-transgenen Donormäusen in letal bestrahlte, ebenfalls ausgewachsene Wildtyp-Rezipienten transplantiert, um die fragliche astrozytäre Umdifferenzierung hämatogener Zellen nach ihrer Einwanderung ins Gehirn der Chimären zu untersuchen. 94% der transplantierten Mäuse überlebten die Phase der Immunsuppression; bei 76% wurde die erfolgreiche Rekonstitution durch Nachweis des GFP-Gens in genomischer Leukozyten-DNA dokumentiert. Die Tatsache, dass dieser Befund nach sechs bis acht Wochen erhoben werden konnte, spricht für eine normale Kinetik der hämatopoetischen Rekonstitution, da ähnliche Intervalle auch für ande-

re Trans-plantationsmodelle angegeben werden (Perry 1992, De Groot 1992, Eglitis 1997, Brazelton 2000). Durch genetische Markierung der übertragenen Zellen mit EGFP konnte an zwei Mäusen gezeigt werden, dass diese Zellen bzw. ihre Nachkommenschaft auch tatsächlich aus dem zirkulierenden Blut ins Hirnparenchym übertreten und dort den Phänotyp ruhender Mikroglia sowie perivaskulärer Zellen annehmen (vgl. auch Priller et al. 2001a). Dies erlaubt die qualitative Aussage, dass im Fall der mit transgenem Knochenmark transplantierten Mäuse ein Influx hämatogener Zellen ins Gehirn stattfindet, der potentielle Astrozyten- und Neuronen--Vorläufer mit großer Wahrscheinlichkeit einschließt: In GFP-Knochenmarkchimären konnten sogar Zellen mit neuronalem Phänotyp im Hirnparenchym nachgewiesen werden (Brazelton 2000, Priller 2001b). Einwanderung und Umwandlung zu perivaskulären und mikroglialen Zellen belegen ein normales biologisches Verhalten der transgenen Leukozyten, wie es anhand von Transplantationsexperimenten mit *ex vivo* markierten Knochenmarkzellen beschrieben worden ist (Perry 1992, De Groot 1992, Kennedy 1997, Ono 1999, Nakano 2001). Bei der Untersuchung der Hirne der für die weiteren Versuche verwendeten Donoren fiel auf, dass die Expression von GFP durch Astrozyten große regionale Unterschiede aufwies und mitunter auch zwischen benachbarten Zellen differierte. Diese Beobachtung war in Übereinstimmung mit den Befunden, die Nolte et al. bei der Charakterisierung des von ihnen entwickelten transgenen Modells erhoben haben (Nolte 2001), und findet ihre Entsprechung auch in der älteren Arbeit über die bereits erwähnte andere GFAP/GFP-transgene Maus (Zhuo 1997). Der Umstand, dass GFP nicht von allen GFAP-positiven Astrozyten in detektierbaren Mengen koexprimiert wird, setzt der Aussagefähigkeit der Transplantationsexperimente theoretische Grenzen: Eine nicht einhundertprozentige Sensitivität des Nachweisverfahrens mittels GFP impliziert zumindest die Möglichkeit, dass die makrogliale Transdifferenzierung hämatogener Zellen im ZNS der Knochenmarkchimären zwar stattfindet, aber im Einzelfall nicht detektiert werden kann. Andererseits ist es nur schwer vorstellbar, dass ausnahmslos alle transgenen Blut- oder Knochenmarkzellen, die sich *in vivo*

oder *in vitro* zu GFAP-exprimierenden Zellen umwandeln, kein nachweisbares GFP-Signal ausprägen und damit der Detektion entgehen. Ein denkbarer Ansatz, diese Möglichkeit zu überprüfen, könnte durch den Nachweis des GFP-Gens in GFAP-positiven Zellen mittels *in-situ*-Hybridisierung geschaffen werden. Einige der GFP-exprimierenden Zellen im Hirnparenchym der transgenen Donoren, besonders im Thalamus, zeigten keine oder nur geringe Immunoreaktivität für GFAP. Auch dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen von Nolte et al. (Nolte 2001) überein. Da im Rahmen unserer Experimente keinerlei GFP-Expression im Gehirn der GFAP/GFP-transgenen Knochenmark-chimären nachzuweisen war, fällt dieser Aspekt hier nicht weiter ins Gewicht; allerdings stellt er ein prinzipielles Problem für die Arbeit mit GFAP--transgenen Mäusen dar. Für das Nagerhirn wurde mehrfach beschrieben, dass die GFAP--Immunoreaktivität inhomogen über alle Regionen verteilt ist und die Sensitivität der GFAP--Immunfärbung kritisch bewertet werden muss (Kalman und Hajos 1989, McLendon 1994). Das Fehlen des GFAP-Signal in einer Zelle bedeutet demnach nicht notwendigerweise, dass sie kein GFAP enthält. Ein sensitiverer und quantitativer Nachweis des Intermediärfilaments wäre allenfalls auf der Ebene der mRNA möglich. Die Verwendung weiterer astroglialer Marker wie z. B. S100 $\beta$  (Boyes 1986) könnte darüber hinaus Aussagen über andere Astrozytenpopulationen des Zentralnervensystems ermöglichen. Eglitis und Mezey berichteten 1997 erstmals über die Expression von GFAP durch hämatogene Zellen, die nach systemischer Knochenmarktransplantation ins Gehirn einwanderten. Die Markierung der Donorzellen erfolgte entweder durch retrovirale Transfektion mit dem bakteriellen neo<sup>R</sup>-Gen oder wurde durch geschlechtsdifferente Transplantation weiblicher Tiere mit männlichem Knochenmark erreicht. Die Autoren verwendeten WBB6F1/J-Kit<sup>w</sup>/Kit<sup>w-v</sup>-Mäuse als Rezipienten, welche einen genetischen Defekt der hämatopoetischen Stammzellen aufweisen. Dieser Umstand bedingt einen großen Repopulationsvorteil für Wildtyp-Donorzellen aus C57bl6-Mäusen, so dass bereits nach subletaler Bestrahlung hohe Rekonstitutionsraten erzielt werden können. Die Autoren berichten, dass vier Wochen nach

Transplantation mittels einer Kombination aus Immunhistochemie (anti-GFAP) und In-situ-Hybridisation (neo<sup>R</sup> bzw. Y-Chromosom) die Expression von GFAP durch hämatogene Zellen im Gehirn dokumentiert werden konnte; die Häufigkeit dieses Befundes wird mit 0,5-2% (aller eingewanderten Zellen) beziffert. Die Verwendung stammzelldefizienter Empfängertiere macht dieses Ergebnis nur schwer auf physiologischere Modelle übertragbar, zumal die Autoren keine Angaben über das Alter der Rezipienten machen und dies einen zusätzlichen Aspekt darstellen könnte, der das Differenzierungsspektrum hämatogener Zellen im Sinne einer größeren Permissivität beeinflusst. In Anlehnung an ihre Vorbefunde publizierten Mezey et al. die Ergebnisse weiterer Transplantationsexperimente, die ebenfalls auf der Rekonstitution von Empfängertieren mit einem schweren hämatopoetischen Defekt beruhten (Mezey 2000a, Mezey 2000b). Hierbei fand eine PU.1-Knockout-Maus Verwendung, die aufgrund eines fehlenden Transkriptionsfaktors eine kongenitale Knochenmarksaplasie aufweist. Dies macht die lebensrettende Knochenmarktransplantation unmittelbar nach der Geburt erforderlich. Nach Angaben der Autoren konnten 1 bis 4 Monate nach Rekonstitution mit geschlechtsdifferentem Knochenmark zahlreiche GFAP-positive Donorzellen im Hirnparenchym sowie in der subependymalen Zone des Ventrikelsystems detektiert werden (Mezey 2000a); 0,3% bis 2,3% der eingewanderten Zellen (Y-Chromosom-positiv) zeigten eine konfokalmikroskopisch verifizierte Kolo-kalisation mit dem nukleären Marker NeuN (Mezey 2000b), so dass damit erstmals auch ein Hinweis auf die mögliche neuronale Differenzierung hämatogener Zellen *in vivo* vorlag. Allerdings ist eine Verallgemeinerung dieses Befundes nicht unproblematisch, da in diesen Versuchen wieder hämatopoetisch schwer insuffiziente – und noch dazu neugeborene – Mäuse als Empfängertiere verwendet wurden. Das Gehirn neonataler Nager unterscheidet sich von dem ausgewachsener Tiere u. a. dadurch, dass das vorherrschende Gewebemilieu stark von Wachstumsfaktoren wie z. B. FGF-2 geprägt ist, die auf die Proliferation von Gliazellen und das Aussprossen neuronaler Zellfortsätze Einfluss nehmen können (Caday 1990). Beide Prozesse laufen im unmittelbar

postnatalen Gehirn in weit größerem Ausmaß ab als zu späteren Zeitpunkten. Auch wenn bisher nur einzelne Aspekte dieses Unterschieds geklärt sind, muss davon ausgegangen werden, dass hämatogene Zellen gerade im neonatalen Gehirn einer Vielzahl von Einflüssen ausgesetzt sein könnten, die ihr jeweiliges Differenzierungsspektrum modifizieren. Brazelton et al. transplantierten dagegen adulte Rezipienten (Brazelton 2000) und verwendeten dazu Knochenmark aus  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen Donormäusen, welches auch bei einem Teil der Kokulturversuche in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde (Okabe 1997). 2 bis 3 Monate nach letaler Bestrahlung und Rekonstitution konnte mittels Durchflusszytometrie von Einzelzellsuspensionen aus Hirn-dissektaten gezeigt werden, dass eine große Fraktion der eingewanderten GFP-positiven Zellen keine leukozytären Oberflächenantigene (CD45, CD11b) mehr exprimierte. In der immunhistochemischen Analyse vorwiegend bulbärer Hirnschnitte erwies sich die Mehrheit der GFP-positiven Zellen im Parenchym als immunoreaktiv für den mikroglialen Marker F4/80, während 0,2-0,3 % neuronenspezifische Proteine wie Neurofilament H und NeuN exprimierten. Es wurden keine eingewanderten Zellen mit GFAP-Expression detektiert. In der Studie von Nakano et al. waren mehrere Monate nach systemischer Transplantation GFP-transfizierter Knochenmarkzellen in bestrahlte adulte Empfängertiere ebenfalls keine GFAP-positiven Donorzellen im Hirn der Chimären zu finden (Nakano 2001). Einige der eingewanderten Zellen erwiesen sich aufgrund ihrer Immunoreaktivität für Iba-1 als Mikrogliazellen/Makrophagen; Kollokalisierungen mit neuronalen und oligodendroglialen Markern waren nicht nachweisbar. Da sowohl Brazelton et al. als auch Nakano et al. keinen Anhaltspunkt für eine Umdifferenzierung der aus dem Blut immigrierten Zellen zu GFAP-positiven Astrozyten fanden, decken sich ihre Befunde in diesem Punkt mit unserer Beobachtung, dass im Gehirn GFAP/GFP-transgener Knochenmarkchimären weder nach einfacher Transplantation noch nach Transplantation in Kombination mit einer fokalen cerebralen Ischämie GFP-positive Zellen nachweisbar sind. Was die immunhistochemische Analyse betrifft, ist es bei Transplantationsexperimenten generell von Bedeutung, dass sowohl



Markierungs- als auch Detektionsverfahren für Donor-zellabkömmlinge eine möglichst genaue zelluläre Kolokalisation von Antigenen zulassen. Dies gilt besonders dann, wenn keine konfokalmikroskopische Auswertung der gefärbten Gewebe durchgeführt wird. In den Arbeiten von Mezey et al. und Brazelton et al. sowie im Rahmen unserer Versuche ist die Forderung nach einer weitgehenden Kongruenz der Fluoreszenz- bzw. Farbsignale auf unterschiedliche Weise erfüllt. Während Mezey et al. zumindest für die Neuronenfärbung ein nukleär gelegenes Antigen (NeuN) verwenden und dadurch die Kolokalisation mit dem Y-Chromosom optimieren, ermöglicht in beiden anderen Fällen das cytoplasmatisch lokalisierte GFP eine morphologische Beurteilung der gesamten Zelle und damit auch etwaiger Überlappungen mit dem jeweiligen spezifischen Zellmarker GFAP oder Neurofilament. Die Kombination aus Zytoskelett- (GFAP) und nukleärer Färbung (In-situ-Hybridisierung des Y-Chromosoms) ist dagegen nicht unproblematisch, da letztere keine Aussage über die Zellmorphologie erlaubt und nicht mit dem cytoplasmatischen GFAP-Signal kolokalisiert. Dies gilt nicht nur für die Astrozytenfärbung in den bereits erwähnten Arbeiten von Eglitis und Mezey, sondern auch für eine weitere Studie von Eglitis et al., in der über die relative Häufung GFAP-positiver hämatogener Zellen in der ischämischen Hemisphäre von Ratten berichtet wird, die 5,5 Wochen nach Knochenmarktransplantation einer permanenten fokalen cerebralen Ischämie unterzogen wurden (Eglitis 1999). Unter Verwendung konventioneller Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie fanden die Autoren bei zwei Tieren nach 48 Stunden Reperfusionzeit 55% mehr Donorzellen in der betroffenen Hirnhälfte als kontralateral, wobei 4,7% der GFAP-positiven Astrozyten auf der Infarktseite das Y-Chromosom aufwiesen (gegenüber 1,8% auf der gegenüberliegenden Seite). Die aus diesem Ergebnis entwickelte Hypothese lautet, dass das fokale und perifokale Gewebemilieu nach cerebraler Ischämie das Differenzierungspotential einwandernder Zellen aus dem Blut erweitern und sogar die Transdifferenzierung zu neuroektodermalen Zelltypen ermöglichen könnte. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit acht GFAP/GFP--

transgene Knochenmarkchimären einer transienten fokalen cerebralen Ischämie unterzogen. Innerhalb eines Zeitraums von bis zu 5 Tagen nach der Ischämie wurden keine GFP--exprimierenden Astrozyten in den Gehirnen dieser Tiere gefunden. Diese Diskrepanz könnte allein dem Umstand zugerechnet werden, dass die Versuche in unterschiedlichen Spezies durchgeführt worden sind. Demgegenüber postuliert eine neuere Studie auch für die adulte Maus, dass sich der fokale Infarkt permissiv auf die astrozytäre Differenzierung von Knochenmarkzellen auswirkt (Li 2000). Vier Tage nach thrombotischem, also permanentem Verschluss der A. cerebri media wurden BrdU-markierte stromale Knochenmarkzellen in das ischämische Striatum injiziert. Nach einem Monat erwiesen sich 8% der implantierten Zellen als immunoreaktiv für GFAP, wobei auch hier wieder darauf hinzuweisen ist, dass BrdU als nukleärer Tracer nicht immer eindeutig mit GFAP kolokalisiert werden kann. Als wesentliche methodische Unterschiede zu den Arbeiten von Eglitis sowie den hier vorgestellten Experimenten sind allerdings die Verwendung stromaler Knochenmarkzellen sowie deren intracerebrale Applikation anzusehen. In der bereits erwähnten Arbeit von Nakano et al. werden die Ergebnisse einer Studie beschrieben, in deren Rahmen Knochenmarkzellen nach Transfektion mit GFP in das Striatum adulter Mäuse injiziert wurden, die zuvor keiner cerebralen Ischämie unterworfen worden waren (Nakano 2001). Die Autoren berichten, dass nach drei Monaten noch zahlreiche GFP-positive Zellen am Injektionsort vorhanden waren, von denen einige Iba-1, GFAP oder CAII (als oligodendroglialen Marker), keine aber NSE koexprimierten. Die intracerebrale Injektion impliziert generell, dass auf diesem Wege auch Zellen ins Hirnparenchym gelangen können, die zwar ein besonders breites Differenzierungsspektrum aufweisen könnten, aber physiologischerweise das Knochenmark nicht verlassen oder nicht zur Überschreitung der Blut-Hirn-Schranke fähig sind. Gerade für stromale Knochenmarkzellen bzw. mesodermale Vorläuferzellen ist bisher nicht geklärt, ob und in welchem Ausmaß sie unter physiologischen Bedingungen im Blut zirkulieren (Bianco 2001). Durch die Besonderheit der direkten intracerebralen Applikation sind auch diejenigen Arbeiten

gekennzeichnet, für die stromale Knochenmarkzellen ohne vorherige Ischämie ins Striatum bzw. in den Seitenventrikel von Nagern injiziert wurden (Azizi 1998, Kopen 1999). Während von Azizi et al. lediglich beschrieben wird, dass die implantierten Zellen Teile ihres stromalen Antigenbesatzes verlieren und ein Astrozyten-ähnliches Migrationsverhalten zeigen, fanden Kopen et al. einige Knochenmarkzellen, die GFAP und z. T. auch Neurofilament exprimierten. Allerdings wurden die stromalen Zellen in letzterem Fall in den Seitenventrikel neugeborener Mäuse eingebracht, in deren Gehirn, wie oben bereits ausgeführt, ein Wachstumsmilieu vorherrscht, das sich aller Wahrscheinlichkeit nach grundlegend von adulten Tieren unterscheidet. Das Problem der intracerebralen Injektion wurde in der Ratte durch die intravenöse oder intraarterielle Infusion BrdU-markierter stromaler Knochenmarkzellen nach fokaler cerebraler Ischämie teilweise umgangen (Chen 2001, Li 2001). 14 bzw. 35 Tage später fanden die Autoren, dass die übertragenen Zellen in der Periinfarktzone akkumulierten, aber auch in anderen Hirnregionen nachweisbar waren. Ein Teil dieser Zellen in der Penumbra exprimierte GFAP oder neuronale Markerantigene wie NeuN und MAP-2; die Zahlenangaben liegen bei 5 bzw. 10% für GFAP, 1-2% für MAP-2 und 1% für NeuN. In Bezug auf die fragliche astrozytäre Umdifferenzierung von Zellen aus dem Blut bzw. Knochenmark konnten die Ergebnisse von Chen und Li in der GFAP/GFP-transgenen Knochenmarkchimäre nicht bestätigt werden. Da gezeigt wurde, dass die von transgenem Donorknochenmark abstammenden Leukozyten ins Hirn übertreten und in der Infarktzone akkumulieren, kann die Divergenz dieser Ergebnisse am ehesten durch methodische Unterschiede erklärt werden. Aus diesen Überlegungen heraus bleibt die Frage der astrozytären Umdifferenzierung hämatogener Zellen im adulten Nagerhirn weiterhin kontrovers, und es wird zusätzlicher Experimente bedürfen, um sie mit hinreichender Sicherheit beantworten zu können. Die Aussagekraft des von uns verwendeten Modells im Hinblick auf weitere Versuche wird durch Experimente gesteigert, in denen die Differenzierung embryonaler neuraler Zellen in GFP-positive Astrozyten nach intrastriatarer Transplantation in adulte Wildtyp-Mäuse gezeigt werden konnte (Wehner et

al. 2003, vgl. auch Renfranz 1991, Gage 1995, Brüstle 1995, Brüstle 1997, Svendsen 1997).

2.

Für die Kokulturversuche wurden native Astrozyten- oder organotypische Hirnschnitt-Kulturen (Slices) mit Knochenmarkzellen beimpft, die entweder konstitutiv GFP exprimierten oder aus GFAP/GFP-transgenen Donortieren stammten. Während eines Zeitraums von 18 Tagen (Astrozyten-Kokultur) bzw. 8 Tagen (*Slice*-Kokultur) wurde in keinem der durchgeführten Experimente eine astrozytäre Umdifferenzierung von Knochenmarkzellen beobachtet. Dagegen konnte durchgehend belegt werden, dass die applizierten Zellen unter allen Kulturbedingungen nach 5 bis 6 Tagen die Morphologie ruhender Mikroglia annehmen und den mikroglial-monozytären Marker Iba-1 exprimieren. Der Umstand, dass unter Verwendung unterschiedlicher Markierungsverfahren von Donor-Knochenmarkzellen in ihrer Aussage gleichartige Ergebnisse erzielt werden konnten, stützt die Verallgemeinerbarkeit der erhobenen Befunde. Die *in vitro* mit dem EGFP-Gen transfizierten Zellen stellen aufgrund der vorausgegangenen Prästimulations- und Transfektionskultur eine andere Population dar als die transgenen Knochenmarkzellen, die direkt nach Entnahme aus der Donormaus für die Kokultur aufbereitet wurden. Sowohl die *in vivo*-Vorbehandlung mit 5-Fluorouracil als auch die Prästimulationskultur in Gegenwart von IL-3, IL-6 und SCF dienten der Selektionierung primitiver hämatopoetischer Vorläuferzellen (Bodine 1991). Zum gleichen Zweck wurden nach Abschluss der Transfektion Sca-1-positive Zellen mittels MACS extrahiert und angereichert. Da in zahlreichen Protokollen die weitgehende Isolierung stromaler Knochenmarkzellen aufgrund ihres adhäsiven Wachstums beschrieben ist (Azizi 1998, Kopen 1999), muss davon ausgegangen werden, dass die auf Astrozyten bzw. *OEHS*C applizierte Population GFP-transfizierter Knochenmarkzellen nach vier Tagen *in vitro* nahezu vollständig aus (nicht adhären) Zellen der Blutbildung bestand. Auch hier liegt ein Unter-

schied zu frisch entnommenem Knochenmark, das ein Gemisch aus hämatopoetischen und stromalen Zellen in reiferen und unreiferen Entwicklungsstadien darstellt.

Der Negativbefund in Bezug auf die Frage der astrozytären Differenzierung GFP-transfizierter Knochenmarkzellen zeigt, dass die mit Kultur, Transfektion und Sortierung verbundenen Manipulationen das Differenzierungspotential dieser Zellen zumindest nicht in Richtung GFAP-exprimierender Astrozyten permissiv beeinflussen konnten.<sup>4</sup> Ebenso wenig war unter den gewählten Bedingungen das Wechselspiel mit den zellulären und azellulären Einflussfaktoren des jeweiligen Kokulturpartners in der Lage, eine solche Differenzierung zu induzieren. Andererseits konnte die Differenzierung von Knochenmarkzellen zu Mikroglia dokumentiert werden, was gegen einen generellen Verlust der Differenzierungsfähigkeit durch die experimentellen Bedingungen spricht. Dies gilt auch für die Versuche, in denen Knochenmark aus  $\beta$ -Actin/GFP-transgenen oder GFAP/GFP-transgenen Mäusen auf Astrozyten bzw. OEHSC kultiviert wurde. Mittels konstitutiver GFP-Expression bzw. BrdU-Markierung konnte gezeigt werden, dass die Knochenmarkzellen in der Kokultur vital blieben und proliferierten. Unter der Prämisse, dass diesmal auch zahlreiche stromale Knochenmarkzellen appliziert wurden (vgl. oben), stehen gerade die Beobachtungen in diesen Experimenten im Widerspruch zu der Arbeit von Sanchez-Ramos et al. (Sanchez-Ramos 2000). Diese Gruppe kultivierte murine und humane stromale Knochenmarkzellen in Gegenwart verschiedener Differenzierungsfaktoren oder zusammen mit primären Neuronenkulturen aus dem Mesencephalon fetaler Nager. Die Autoren berichten über das vereinzelte Auftreten GFAP- und NeuN-positiver Knochenmarkzellen nach 7 Tagen in Neuronenmedium. In Anwesenheit von *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und all-trans-Retinoinsäure (RA) erwiesen sich bis zu 1% der Zellen als immunoreaktiv für GFAP und 0,5%

---

<sup>4</sup> Bianco 2001: How much of the „stemness“ (self-renewal and multipotency) observed in experimental systems is inherent to the cells that we manipulate, and how much is due to the manipulation?

für NeuN; in der Kokultur mit fetalen Neuronen (inkl. BDNF und RA) erhöhten sich diese Werte auf 5-8% (GFAP) und 2-4% (NeuN). Mehrere methodische Aspekte können als potentielle Ursache für die Induktion der GFAP-Expression in den stromalen Zellen diskutiert werden. Das von Sanchez-Ramos verwendete Kulturmedium enthielt primär vergleichsweise geringe Mengen an Pferde- und Kälberserum sowie u. a. die Hormone Insulin und Progesteron. Außerdem muss angenommen werden, dass sowohl die Differenzierungsfaktoren BDNF und RA als auch die Kokultur auf fetalen Neuronen einen grundlegend anderen Einfluss auf die Knochenmarkzellen entfalten als die in den hier vorgestellten Experimenten gewählten Bedingungen. Diese waren durch den Verzicht auf Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie durch die Kultur des Knochenmarks auf postnatal gewonnenen Geweben gekennzeichnet.

Die Bedeutung unterschiedlicher Protokolle zur Induktion einer neuroektodermalen Differenzierung von Knochenmarkzellen wird dadurch betont, dass Woodbury et al. stromale Knochenmarkzellen in Anwesenheit von  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) kultivierten und keine GFAP-positiven Zellen beobachten konnten (Woodbury 2000). Dagegen nahmen die stromalen Zellen unter dem Einfluss der genannten Substanzen innerhalb weniger Stunden Neuronen-ähnliche Morphologie an und exprimierten in der Folge unterschiedliche neuronale Marker wie NSE (Neuron-spezifische Enolase), Nestin, *Tau* und trkA.

Auch im *in vitro*-Bereich sind weiterführende Experimente erforderlich, um das makrogliale Differenzierungspotential adulter Knochenmarkzellen näher zu charakterisieren und Kulturbedingungen zu etablieren, unter denen dieses Potential optimal ausgenutzt werden kann.

In den beschriebenen Zellkulturversuchen wurde nicht nur das makrogliale, sondern auch das mikrogliale Differenzierungspotential adulter Knochenmarkzellen untersucht. Zahlreiche GFP-exprimierende Knochenmarkzellen – transfiziert oder transgen – entwickelten in der Kokultur auf murinen Astrozyten bzw. organotypischen Hirnschnitten nach weniger als einer Woche eine Morphologie, die mit derjenigen ramifizierter Mikrogliazellen *in situ* vergleichbar ist. Als morphologisches Kriterium der mikroglialen Transformation diente dabei das Vorhandensein mindestens zweier feiner Zellfortsätze, die von einem länglichen Zellkörper ausgehen und sekundäre Verzweigungen aufweisen (del Rio Hortega 1932, Lawson 1990, Sievers 1994a). Zusammen mit dem Befund, dass diese ramifizierten GFP-positiven Zellen ausnahmslos den Mikroglia/Makrophagen-Marker Iba-1 exprimierten, bilden diese Beobachtungen einen Beitrag zu der nach wie vor nicht abgeschlossenen Debatte um die Herkunft der Mikroglia. Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, tendiert ein Großteil der entsprechenden Literatur zu der Annahme, dass sich Mikrogliazellen von der monozytären Zellreihe herleiten. Hierfür sprechen zahlreiche Befunde, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erhoben worden sind und in deren Kontext die eigenen Ergebnisse im folgenden eingeordnet werden sollen.

Während der Embryonalentwicklung des Gehirns treten Mikrogliazellen als distinkte Zellpopulation mit charakteristischer Morphologie erst auf, nachdem die Vaskularisation der ZNS-Anlage begonnen hat (Juba 1934<sup>5</sup>). Bis in die Postnatalzeit hinein wandern monozytoide Zellen aus den Gefäßen und dem meningealen Gefäßbindegewebe (Boya 1991) ins Parenchym ein. Im murinen Gehirn sind makrophagenähnliche Zellen ab E13 nachweisbar und können perinatal in der ge-

---

<sup>5</sup> Juba A. 1934. Untersuchungen über die Entwicklung der Hortegaschen Microglia des Menschen. Arch Psychiatr Nervenkr 101: 577-592. Zitiert in: Ling und Wong 1993.

samen weißen Substanz detektiert werden (de Groot 1992). Diese sogenannten amöboiden Mikrogliazellen weisen in der frühen postnatalen Phase eine hohe mitotische Aktivität auf, paradoxerweise nimmt aber ihre Zahl nach der ersten Lebenswoche kontinuierlich ab (de Groot 1992, Ling und Wong 1993). Dieses Phänomen korreliert zeitlich mit einem massiven Proliferationsschub der ramifizierten Mikrogliazellen im Hirnparenchym. Ling et al. klärten diesen Zusammenhang dahingehend auf, dass Monozyten (auch noch) in der frühen Postnatalzeit aus dem Blut ins Gewebe einwandern, dann das Stadium der amöboiden Mikroglia durchlaufen und schließlich die Morphologie ruhender Mikrogliazellen annehmen (Ling 1979, Leong und Ling 1992). Diese Befunde weisen klar auf den hämatogenen Ursprung der Mikroglia zumindest in der Phase der Ontogenese hin. Sie werden unterstützt durch den Umstand, dass die Existenz von Mikrogliazellen im Gehirn an ein intaktes hämatopoetisches System gebunden ist, da myeloaplastische PU.1-Knockout-Mäuse zum Zeitpunkt ihrer Geburt über keine Mikroglia verfügen und diese erst nach Knochenmarktransplantation aufweisen (Mezey 2000). Umstritten ist allerdings nach wie vor die Frage, ob der Influx von Monozyten ins Gehirn und ihre mikrogliale Umwandlung bereits in der Postnatalperiode sistieren oder noch darüber hinaus eine Rolle spielen. An Knochenmarkchimären bzw. durch Leukozyten-Labeling wurden Erkenntnisse darüber gewonnen, dass auch im adulten Organismus Mikrogliazellen in begrenztem Umfang aus dem Blut rekrutiert werden (de Groot 1992, Lawson 1992, Eglitis 1997, Ono 1999). Dem entspricht die für die vorliegende Arbeit wichtige Beobachtung, dass im Gehirn zweier adulter Mäuse, die mit GFP-transfiziertem GFAP/GFP-transgenen Knochenmark transplantiert wurden, ramifizierte Mikrogliazellen mit Expression von GFP vorhanden waren. Eigene, an GFP-Knochenmarkchimären erhobene Ergebnisse legen sogar nahe, dass die Einwanderung von Mikroglia-Vorläufern ins ZNS der adulten Maus nach Knochenmarktransplantation in einem Ausmaß stattfindet, das über Einzelereignisse weit hinausgeht (Priller et al. 2001a). *In vitro* wiesen Monozyten und Makrophagen wesentliche Gemeinsamkeiten mit Mikrogliazellen auf. Beide



Zelltypen exprimieren nach Aktivierung ähnliche Antigenmuster (siehe Einleitung) und sind zur Phagozytose fähig. Bereits 1935 wurde beschrieben, dass eine Subpopulation kultivierter Leukozyten resident-mikrogliale Morphologie annimmt (Dunning und Furth 1935<sup>6</sup>). Milzmakrophagen und Monozyten ramifizieren in der Kokultur auf Astrozyten nach einiger Zeit und lassen sich weder morphologisch noch elektrophysiologisch von amöboiden Mikrogliazellen unterscheiden, die unter identischen Bedingungen kultiviert werden (Sievers 1994a, Sievers 1994b, Schmidtmayer 1994, Wilms 1997). Auf Makrophagen aus dem Knochenmark wurde ein Profil membranständiger Ionenkanäle nachgewiesen, das auch für Mikrogliazellen typisch ist (Banati 1991). Der Umstand, dass das Wachstum von Knochenmarkzellen auf Astrozyten oder *OEHS*C mit der Entwicklung mikroglialer Phänotypen einhergeht, bestätigt die Ergebnisse von Sievers et al., da Knochenmark einerseits Gewebemakrophagen, andererseits aber auch zahlreiche monozytäre Vorstufen enthält. In den Versuchen von Sievers et al. zeigte ein kleiner Teil der applizierten Zellen bereits in der Kultur mit Astrozyten-konditioniertem Medium (d. h. ohne zellulären Untergrund) eine Mikroglia-ähnliche Transformation. Dies war in den hier dargestellten Experimenten mit Knochenmarkzellen nicht der Fall, so dass der Interaktion mit den unlöslichen Faktoren aus Astrozyten bzw. organotypischen Hirnschnitten besondere Bedeutung zugeschrieben werden muss. Auf astrozytären Monolayers ist der Anteil ramifizierter Mikroglia/Makrophagen deutlich größer als auf azellulären Substraten (Sievers 1994b, Tanaka 1996); zudem behalten Mikrogliazellen ihre amöboide Form, wenn sie bei nicht konfluenter Astrozytenkultur in den Zellzwischenräumen wachsen (Tanaka 1999). Der Schluss liegt nahe, dass mikrogliale Vorläuferzellen (Monozyten), die in der Embryonal- und Fetalzeit oder auch viel später die Blut-Hirn-Schranke passieren, nicht allein aus sich heraus, sondern nur durch Wechselwirkung mit der intracerebralen Umgebung zu Mikroglia differenzieren. Werden aktivierte Mikrogliazellen auf *OEHS*C ap-

---

<sup>6</sup> Dunning HS, Furth J. 1935. Studies in the relation between microglia, histiocytes and monocytes. Am J Pathol 11: 895-919.  
Zitiert in: Ling und Wong 1993.

pliziert, wandern sie in die Schnittkulturen ein und ramifizieren innerhalb weniger Tage (Hailer 1997). In einem vergleichbaren Zeitraum lassen sich identische Beobachtungen an GFP-markierten Knochenmarkzellen machen; bei längerer Dauer der Kokultur verlangsamt sich dieser Prozess allerdings zusehends. Eine ähnliche Kinetik zeigt das Verhalten der intrinsischen Mikrogliazellen in *OEHSC*, die innerhalb der ersten Tage *in vitro* auf das Präparationstrauma reagieren, indem sie eine amöboide Gestalt annehmen. Erst im weiteren Verlauf beginnen sie, sich wieder zu ramifizieren und haben nach etwa 9 Tagen ihre ursprüngliche Morphologie wiedererlangt (Hailer 1996). Für die vorliegende Arbeit wurden die Knochenmarkzellen erst 5 bis 7 Tage nach Präparation der Slices appliziert, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Ramifikation der intrinsischen Mikroglia bereits weit vorangeschritten war. Am dritten Tag nach Beginn der Kokultur zeigten neben den markierten Zellen aber auch die meisten der GFP-negativen, Iba-1-positiven Zellen wieder runde bzw. unverzweigte Morphologien. Dies spricht dafür, dass die Applikation der Knochenmarkzellen einen Stimulus darstellte, der zur erneuten Aktivierung der gewebeständigen Mikroglia führte. Im weiteren Verlauf der Kokultur bis zum 8. Tag nahmen Teile beider Zellpopulationen synchron wieder die Gestalt ramifizierter Mikroglia an. Die Reversibilität dieser morphologischen Übergänge unterstützt die Annahme, dass es sich bei amöboiden und ramifizierten Mikrogliazellen auch *in vivo* nicht um unterschiedliche Zellpopulationen handelt, sondern um einen Zelltypus, der in Abhängigkeit von der jeweiligen Lokalisation und funktionellen Beanspruchung verschiedene Phänotypen ausprägt.

## Literaturverzeichnis

- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335.
- Aschner M. 1998. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory response. *Neurotoxicology* 19: 269-281.
- Aubert I, Ridet JL, Gage FH. 1995. Regeneration in the adult mammalian CNS: guided by development. *Curr Opin Neurobiol* 5: 625-635.
- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop D. 1998. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats - similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3908-13.
- Banati RB, Hoppe D, Gottmann K, Kreutzberg GW, Kettenmann H. 1991. A subpopulation of bone marrow derived macrophages share a unique ion channel pattern with microglia. *J Neurosci Res* 30: 593-600.
- Barber P, Lindsay R. 1982. Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience* 7: 3077-3090.
- Bartlett PF. 1982. Pluripotential hematopoietic stem cells in adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2722-2725.
- Becher B, Prat A, Antel JP. 2000. Brain-immune connection: Immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 29: 93-304.
- Bechmann I, Priller J, Kowac A, Böntert M, Wehner T, Fernandez Klett F, Bohsung J, Stuschke M, Dirnagl U, Nitsch R. 2001. Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur J Neurosci* 14: 1651-1658.
- Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. 1991. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 99: 131-139.

- Bernier L, Colman DR, D'Eustachio P. 1988. Chromosomal locations of genes encoding 2', 3' cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and glial fibrillary acidic protein in the mouse. *J Neurosci Res* 20: 497-504.
- Bianco P, Costantini M, Dearde LC, Bonucci E. 1988. Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow. *Br J Haematol* 68: 401-403.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. 2001. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology and potential applications. *Stem Cells* 19: 180-192.
- Bierhuizen M, Westerman Y, Visser TP, Wognum AW, Wagemaker G. 1997. Enhanced green fluorescent protein as a selectable marker of retroviral-mediated gene transfer in immature hematopoietic bone marrow cells. *Blood* 90: 3304-3315.
- Björklund H, Dahl D. 1985. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rodent eye. Comparison between peripheral glia of the anterior uvea and central glia of the retina. *J Neuroimmunol* 8: 331-345.
- Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. 1999. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283: 534-37.
- Bodine DM, Karlsson S, Nienhuis AW. 1989. Combination of interleukins 3 and 6 preserves stem cell function in culture and enhances retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8897-901.
- Bodine DM, McDonagh KT. 1991. Survival and retrovirus infection of murine hematopoietic stem cells in vitro: Effects of 5-FU and method of infection. *Exp Hematol* 19: 206-12.
- Bongcam-Rudloff E, Nistér M, Betsholtz C, Wang JL, Stenman G, Huebner K, Croce CM, Westermarck B. 1991. Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. *Cancer Res* 51: 1553-1560.

- Boya J, Calvo JL, Carbonell AL, Borregon A. 1991. A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J Anat* 175: 229-236.
- Boyes BE, Kim SU, Lee V, Sung SC. 1986. Immunohistochemical co-localization of S100 $\beta$  and the glial fibrillary acidic protein in rat brain. *Neuroscience* 17: 857-865.
- Braun JS, Jander S, Schroeter M, Witte OW, Stoll G. 1996. Spatiotemporal relationship of apoptotic cell death to lymphomonocytic infiltration in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Acta Neuropath* 92: 255-263.
- Brazelton T, Rossi FMV, Keshet GI, Blau HM. 2000. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290: 1775-79.
- Brenner M. 1994. Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol* 4: 245-57.
- Brenner M, Kisseberth WC, Su Y, Besnard F, Messing A. 1994. GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci* 14: 1030-1037.
- Bressler JP, Grotendorst GR, Levitov C, Hjelmeland LM. 1985. Chemotaxis of rat brain astrocytes to platelet derived growth factor. *Brain Res* 344: 249-254.
- Caday CG, Klagsbrun M, Fanning PJ, Mirzabegian A, Finklestein SP. 1990. Fibroblast growth factor (FGF) in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 52: 241-246.
- Carmignoto G. 2000. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurons. *Prog Neurobiol* 62: 561-581.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Chauvet N et al. 1997. Mab22C11 antibody to amyloid precursor protein recognizes a protein associated with specific astroglial cells of the rat central nervous system characterized by their capacity to support axonal outgrowth. *J Comp Neurol* 377: 550-564.

- Chen H, Chopp M, Schultz L, Bodzin G, Garcia JH. 1993. Sequential neuronal and astrocytic changes after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 118: 109-116.
- Chen J, Li Y, Chopp M. 2000. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAO in rat. *Neuropharmacology* 39: 711-716.
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Dunyue L, Lu M, Chopp M. 2001. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32: 1005-1011.
- Cheng L, Fu J, Tsukamoto A, Hawley RG. 1996. Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nature Biotech* 14: 606-609.
- Cheshier S, Morrison SJ, Liao X, Weissman I. 1999. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3120--3125.
- Chopp M, Zhang RL, Chen H, Li Y, Jiang N, Rusche JR. 1994. Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 25: 869-876.
- Chu VT, Gage FH. 2001. Chipping away at stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7652-7653.
- Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J. 2000. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288: 1660-63.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7841-7845.
- Cramer SC, Chopp M. 2000. Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci* 23: 265-271.

- De Groot CJ, Huppes W, Sminia T, Kraal G, Dijkstra CD. 1992. Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. *Glia* 6: 301-309.
- Del Zoppo GJ, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ. 2000. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* 10: 95-112.
- Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392: 505-509.
- Donnelly DS, Krause DS. 2001. Hematopoietic stem cells can be CD34+ or CD34-. *Leuk Lymphoma* 40: 221-234.
- Dorf ME, Berman MA, Tanabe S, Heesen M, Luo Y. 2000. Astrocytes express functional chemokine receptors. *J Neuroimmunol* 111: 109-121.
- Eddleston M, al Torre JC, Campbell IL, Oldstone MB. 1996. The M22 antibody identifies highly activated reactive astrocytes responding to central nervous system disease. *Acta Neuropathologica* 91: 298-308.
- Eglitis MA, Dawson D, Park KW, Mouradian MM. 1999. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuro Report* 10: 1289-1292.
- Eglitis M, Mezey É. 1997. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4080-4085.
- Eng LF, Gerstl B, Vanderhaeghen JJ. 1970. A study of proteins in old multiple sclerosis plaques. *Trans Am Soc Neurochem.* 1: 42.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25: 1439-1451.
- Fawcett J. 1994. Astrocytes and axon regeneration in the central nervous system. *J Neurol* 242 (1 Suppl 1): S25-S28.

- Ferrari G, Cusella-DeAngelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530.
- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. 1999. Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. *Ann N Y Acad Sci* 825: 179-193.
- Finklestein SP, Caday CG, Kano M, Berlove DJ, Hsu CY, Moskowitz M, Klagsbrun M. 1990. Growth factor expression after stroke. *Stroke* 21 (11 Suppl): III 122-124.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. 1968. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230-247.
- Friedenstein AJ et al. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2: 83-92.
- Furukawa Y. 1998. Cell cycle regulation of hematopoietic stem cells. *Hum Cell* 11: 81-92.
- Fuss B, Mallon B, Phan T, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Nishiyama A, Macklin WB. 2000. Purification and analysis of in vivo differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. *Dev Biol* 218(2): 259-274.
- Garcia JH. 1984. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke* 15: 5-14.
- Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Liao J, Chen S, del Zoppo GJ. 1994. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct. *Am J Pathol* 144: 188-199.
- Gard AL, White FP, Dutton G. 1985. Extra-neural glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. *J Neuroimmunol* 8: 359-375.
- Gates MA, Thomas LB, Howard EM, Laywell ED, Sajon B, Faissner A, Gotz B, Silver J, Stindler DA. 1995. Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. *J Comp Neurol* 361: 249-266.



- George R, Griffin JW. 1994. Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system. *Exp Neurol* 129: 225-236.
- Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP. 1997. Efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3: 1337-1345.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MSA, Gross CG. 1999. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286: 548-552.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390-394.
- Hajdantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A. 1998. Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev* 76: 79--90.
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D, Nitsch R. 1997. Fluorescent dye prelabelled microglial cells migrate into organotypic hippocampal slice cultures and ramify. *Eur J Neurosci* 9: 863--866.
- Hailer NP, Jarhult JD, Nitsch R. 1996. Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18, 319-331.
- Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA. 1996. Reduced brain edema and infarction in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 605-611.
- Harrison DE, Stone M, Astle CM. 1990. Effects of transplantation on the primitive immuno-hematopoietic stem cell. *J Exp Med* 172: 431-437.

- Hayashi T et al. 1997. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 28: 2039-2044.
- Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carroll J, Brailer J, Carothers J. 2002. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 33: 1362-1368.
- Hickey WF, Vass K, Lassmann H. 1992. Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J Neuropath Exp Neurol* 51: 246-256.
- Holland EC, Varmus HE. 1998. Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1218-1223.
- Hossmann KA. 1995. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36: 557-565.
- Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. 1996. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 855-862.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y. 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba 1*. *Brain Res Mol Brain Res* 57: 1-9.
- Jackson KA, Mi T, Goodell MA. 1999. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14482-14486.
- Jessen KR, Mirsky R. 1985. Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution. *J Neuroimmunol* 8(4-6): 377-393.
- Kalman M, Hajos F. 1989. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. I. Forebrain. *Exp Brain Res* 78: 147-163.
- Kato H, Kogure K, Liu XH, Araki T, Itoyama Y. 1996. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 734: 203-212.

- Kato H, Walz H. 2000. The initiation of the microglial response. *Brain Pathol* 10: 137-143.
- Kawakami N, Sakane N, Nishizawa F, Iwao M, Fukada SI, Tsujikawa K, Kohama Y, Ikawa M, Okabe M, Yamamoto H. 1999. Green fluorescent protein-transgenic mice: immune functions and their application to studies of lymphocyte development. *Immunol Lett* 70(3): 165-171.
- Kennedy DW, Abkowitz JL. 1997. Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: Analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood* 90: 986-993.
- Kennedy DW, Abkowitz JL. 1998. Mature monocytic cells enter tissues and engraft. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14944-14949.
- Kessinger A. 1995. Circulating stem cells - waxing hematopoietic. *N Engl J Med* 333: 315-317.
- Kniss DA, Burry RW. 1988. Serum and fibroblast growth factor stimulate quiescent astrocytes to re-enter the cell cycle. *Brain Res* 439: 281-288.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10700-10716.
- Korr H. 1994. Problems encountered when immunocytochemistry is used for quantitative glial cell identification in autoradiographic studies of cell proliferation in the brain of the unlesioned mouse. *Cell Tissue Res* 278: 85-95.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. 2001. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105: 369-377.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissmann IL, Grompe M. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate to hepatocytes in vivo. *Nature Med* 6: 1229-1234.

- Lassmann H, Schmied M, Vass K, Hickey WF. 1993. Bone marrow-derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* 7: 19-24.
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. 1992. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48: 405-415.
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39: 151-170.
- Lee JC, Mayer-Proschel M, Rao MS. 2000. Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30: 105-121.
- Lemischka I. 1999. The power of stem cells reconsidered? *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14293--14195.
- Lerner C, Harrison DE. 1990. 5-Fluorouracil spares hematopoietic stem cells responsible for long-term repopulation. *Exp Hematol* 18: 114.
- Lewis SA, Balcarek JM, Krek V, Shelanski M, Cowan NJ. 1984. Sequence of a cDNA encoding mouse glial fibrillary acidic protein: structural conservation of intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2743-2746.
- Li Y, Chen J, Chopp M. 2001. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant* 10: 31-40.
- Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, Chopp M. 1995. Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 146: 1045-1051.
- Li Y, Chopp M, Zhang ZG, Zhang RL. 1995. Expression of glial fibrillary acidic protein in areas of focal cerebral ischemia accompanies neuronal expression of 72-kDa heat shock protein. *J Neurol Sci* 128: 134-142.
- Li Y, Chopp M, Powers C, Jiang N. 1997. Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 765: 301-312.

- Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M. 2001b. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* 56: 1666-1672.
- Li Y, Chopp M. 1999. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in the adult rat. *Brain Res* 838: 1-10.
- Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Zhang Z. 2000. Intrastratial transplantation of nonhematopoietic bone marrow cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (9): 1311-1319.
- Ling EA. 1979. Transformation of monocytes into ameboid microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labelling monocytes by carbon particles. *J Anat* 128: 847
- Ling EA, Wong WC. 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: A historical review and current concepts. *Glia* 7: 9-18.
- Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. 1993. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24: 2002-2009.
- Lipton P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Phys Rev* 79: 1431-1568.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. 1994. Long distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264: 1145-1148.
- McCarthy KD, De Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85: 890-902.
- McAuley MA. 1995. Rodent models of focal ischemia. *Cerebrovasc Brain Metabol Rev* 7: 153--180.
- McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, Zhang CL, Pearce RA, Chiu SY, Messing A. 1996. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (GFAP) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6361-6366.
- McLendon RE, Bigner DD. 1994. Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: Basic and applied considerations. *Brain Pathol* 4: 221-228.

- Mezey E, Chandross KJ. 2000a. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol* 405: 297-302.
- Mezey È, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290: 1779--1782.
- Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Wahl SM. 1992. Cytokines and neuropathology. *Trends Pharm Sci* 13: 286-291.
- Morrison SJ. 2000. Stem cell potential: Can anything make anything? *Curr Biol* 11: R7-R9.
- Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, van der Kooy D. 2002. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nature Medicine* 8(3):268-273.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8424-8428.
- Nakano K, Migita M, Mochizuki H, Shimada T. 2001. Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain. *Transplantation* 71: 1735-1740.
- Nichols NR, Day JR, Laping NJ, Johnson SA, Finch CE. 1993. GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiol Aging* 14: 421-429.
- Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H. 2001. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33: 72-86.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 1997. Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407(3): 313-319.

- Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. 1992. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* 80: 3044-3050.
- Ono K, Takii T, Onozaki K, Ikawa M, Okabe M, Sawada M. 1999. Migration of exogenous immature hematopoietic cells into adult mouse brain parenchyma under GFP-expressing bone marrow chimera. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 610-614.
- Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD, Kain SR, Piston DW. 1997. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 73: 2782--2790.
- Perry VH, Andersson PB, Gordon S. 1993. Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci* 16: 268-273.
- Persons DA, Allay JA, Allay ER, Smeyne RJ, Ashmun RA, Sorrentino BP, Nienhuis AW. 1997. Retroviral-mediated transfer of the green fluorescent protein into murine hematopoietic cells facilitates scoring and selection of transduced progenitors in vitro and identification of genetically modified cells in vivo. *Blood* 90: 1777-1786.
- Persons DA, Mehaffey MG, Kaleko M, Nienhuis AW, Vanin EF. 1998. An improved method for generating retroviral producer clones for vectors lacking a selectable marker gene. *Blood Cells Mol Dis* 24: 167-182.
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284: 1168-1170.
- Polli E. 2000. Transplanting bone-marrow stem cells into the central nervous system. *Haematologica* 85: 1009-1010.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233.

- Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer B, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U. 2001. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nature Medicine* 7 (12): 1356-1361.
- Priller J, Persons DA, Fernandez-Klett F, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U. 2001. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol*, 155 (5): 733–738.
- Rao MS, Noble M, Mayer-Proschel M. 1998. A tripotential glial precursor is present in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3996-4001
- Reilly JF, Kumari VG. 1996. Alterations in fibroblast growth factor receptor expression following brain injury. *Exp Neurol* 140: 139-150.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20: 570-577.
- Rio Hortega del P. 1932. Microglia. In: Penfield W (ed.), *Cytology and cellular pathology of the nervous system*. Vol. 2, 481-584.
- Ritter LS, Orozco JA, Coull BM, McDonagh PF, Rosenblum WI. 2000. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke* 31: 1153-1161.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164: 247-256.
- Savaskan NE, Eyupoglu IY, Brauer AU, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R, Skutella T. 2000. Entorhinal cortex lesion studied with the novel dye fluoro-jade. *Brain Research* 864: 44--51.



- Scheffler B, Horn M, Blumcke I, Langwell ED, Coomes D, Kukekov VG, Steindler DA. 1999. Marrow-mindedness: a perspective on neuropoiesis. *Trends Neurosci* 22: 348-357.
- Schmidt Mayer J, Jacobsen C, Miksch G, Sievers J. 1994. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia* 12: 259-267.
- Schroeter M, Jander S, Huitinga I, Witte OW, Stoll G. 1997. Phagocytic response in photochemically induced infarction of the rat cerebral cortex: the role of resident microglia. *Stroke* 28: 382-386.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239.
- Sievers J, Parwaresch R. 1994. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells when cultured on astrocytes. *Ann Anat* 176: 45-51.
- Sievers J, Parwaresch R, Wottge HU. 1994. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia* 12: 245--258.
- Smart I. 1961. The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection. *J Comp Neurol* 116: 325-338.
- Smith GH, Hale JH. 1997. Macrophage/microglia regulation of astrocytic tenascin: synergistic action of transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 17: 9624-9633.
- Spangrude GJ. 1994. Biological and clinical aspects of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Med* 45: 93-104.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241: 58-62.
- Spangrude GJ, Klein J, Heimfeld S, Aihara Y, Weissman IL. 1989. Two monoclonal antibodies identify thymic-repopulating cells in mouse bone marrow. *J Immunol* 142: 425-430.

- Stoll G, Jander S, Schroeter M. 1998. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progress in Neurobiology* 56: 149-171.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. 1988. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1: 301-307.
- Stroemer R et al. 1998. Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. *Stroke* 29: 2381-2395.
- Sturrock RR, Smart I. 1980. A morphological study of the mouse subependymal layer from embryonic life to old age. *J Anat* 130: 391-415.
- Tanaka J, Maeda N. 1996. Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. *Exp Neurol* 137(2): 367-375.
- Tanaka J, Toku K, Sakanaka M, Maeda N. 1999. Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes. *Neurosci Res* 34: 207-215.
- Terskikh A, Easterday MC, Li L, Hood L, Kornblum HI, Geschwind DH, Weissman IL. 2001. From hematopoiesis to neuropoiesis: Evidence of overlapping genetic programs. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7934-7939.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7844-7848.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP. 1996. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 55: 254-259.
- Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544.

- Ulvestad E, Williams K, Mork S, Antel J, Nyland H. 1994. Phenotypic differences between human monocytes/macrophages and microglial cells studied in situ and in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 492-501.
- Unger ER, Sung JH, Manivel JC, Chenggis ML, Blazar BR, Krivit W. 1993. Male donor-derived cells in the brains of female sex-mismatched bone marrow transplant recipients: A Y-chromosome specific in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol* 52: 460-470.
- Van de Rijn M, Heimfeld S, Spangrude GJ, Weissmann IL. 1989. Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4634-4638.
- Vesce S, Bezzi P, Volterra A. 1999. The active role of astrocytes in synaptic transmission. *Cell Mol Life Sci* 56: 991-1000.
- Vijayan VK, Lee YL, Eng LF. 1990. Increase in glial fibrillary acidic protein following neural trauma. *Mol Chem Neuropathol* 13: 107-118.
- Wang X, Feuerstein GZ. 1995. Induced expression of adhesion molecules following brain ischemia. *J Neurotrauma* 12: 825-832.
- Wehner T, Böntert M, Eyuepoglu I, Prass K, Prinz M, Fernandez Klett F, Heinze M, Bechmann I, Nitsch R, Kirchhoff F, Kettenmann H, Dirnagl U, Priller J. 2003. Bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo. *J Neuroscience* 23(12): 5004-5011.
- Weinstein DE, Shelanski ML, Liem RK. 1991. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J Cell Biol* 112: 1205-1213.

- Wilms H, Hartmann D, Sievers J. 1997. Ramification of microglia, monocytes and macrophages in vitro: Influences of various epithelial and mesenchymal cells and their conditioned media. *Cell Tissue Res* 287: 447-458.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61: 364-370.
- Yang F, Moss LG, Phillips GN. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 14: 1246-1251.
- Yu AC, Lau LT. 2000. Expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 genes in astrocytes under ischemic injury. *Neurochem Int* 36: 369-377.
- Zenker W. Feinstruktur des Nervengewebes. In: Benninghoff. Anatomie. hrsg. von D. Drenckhahn und W. Zenker. München 1994.
- Zhang ZG, Chopp M, Powers C. 1997. Temporal profile of microglial response following transient (2h) middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 744: 189-198.
- Zhuo L, Sun B, Zhang CL, Fine A, Chiu SY, Messing A. 1997. Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. *Dev Biol* 187: 36-42.

## Anhang

### Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor	NF	Neurofilament
BrdU	Bromdesoxyuridin	NGF	Nerve Growth Factor
BSA	Bovines Serumalbumin	NGS	Normal Goat Serum
CA	Cornu ammonis	NSC	Neural Stem Cell
CD	Cluster of Differentiation	NSE	Neuronspezifische Enolase
CFU	Colony Forming Unit	OEHS	Organotypic Entorhinal-- Hippocampal Slice Culture
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	P, P8	(8.) postnataler Entwick- lungstag
E, E12	(12.) embryonaler Entwicklungs- tag	PBS	Phosphate Buffered Saline
EGF (-R)	Epidermal Growth Factor (- Receptor)	(w/o)	(without)
(E)GFP	(Enhanced) Green Fluorescent Protein	PCR	Polymerase Chain Reaction
ES cells	Embryonic Stem Cells	PFA	Paraformaldehyd
FACS	Fluorescence Activated Cell Sort- ing	RA	Retinoic Acid
FGF(-R)	Fibroblast Growth Factor (- Receptor)	rHu	Rekombinant human
FKS	Fötales Kälberserum	rMu	Rekombinant murin
		rpm	Rounds per Minute

GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein	rSCF	Rat Stem Cell Factor
HSC	Hematopoietic Stem Cell	SA	Streptavidin
Iba-1	Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1	Sca-1	Stem Cell Antigen 1
IGF	Insulin-like Growth Factor	SEZ	Subependymalzone
IL	Interleukin	SGZ	Subgranuläre Zone
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting	SVZ	Subventrikuläre Zone
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2	TNF	Tumor Necrosis Factor
MEM	Modified Eagle's Medium	VEGF	Vascular Endothelial- derived Growth Factor
MSC	Marrow Stromal Cells		

## Tabellarischer Lebenslauf

Name	Matthias Boentert
Geburtsdatum	13.01.1973
Geburtsort	Dorsten
Familienstand	verheiratet mit Annika Boentert, geb. Notz
Ausbildung	
1983 – 1992	Gymnasium St. Ursula, Dorsten
1992 – 1993	Zivildienst, Marienhospital, Marl
1993 – 1994	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
1994 – 2001	Studium der Humanmedizin und des Studium fundamentele an der Universität Witten/Herdecke, Witten
1997	viermonatiges Auslandsstudium an der University of Bristol Medical School, Bristol, England
1999 – 2000	Dissertationsprojekt in der Abteilung für Experimentelle Neurologie (Direktor: Prof. Dr. U. Dirnagl), Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
2000	viermonatiges Auslandsstudium am Metro Health Medical Centre, Cleveland, Ohio, USA
2001	26.04.2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Witten/Herdecke
Stipendien	
1995 – 2001	Cusanuswerk, Bischöfliche Studienförderung, Bonn

1999 – 2000	Deutsche Forschungsgemeinschaft, Graduiertenkolleg 238 „Schadensmechanismen im Nervensystem“, Humboldt-Universität zu Berlin
Berufstätigkeit	
01.10.2001 bis 31.03.2003	Arzt im Praktikum, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Münster
seit 01.04.2003	Assistenzarzt, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Münster



## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt, und dass die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur vollständig angegeben sind.

Münster, den 10. November 2003

Matthias Boentert

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl und Herrn Prof. Dr. med. Josef Priller für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung der gesamten Dissertation. Bei beiden Genannten sowie insbesondere bei Dr. med. Tim Wehner und Francisco Fernández-Klett bedanke ich mich für Teamwork und Zusammenhalt der „AG Grün“, durch die der erfolgreiche Abschluss unserer Projekte erst möglich geworden ist. Claudia Muselmann, Dr. rer. nat. Dorette Freyer, Renate Gusinda, Dr. med. Juri Katchanov, Dr. med. Ilker Eyüepoglu, Dr. rer. nat. Bauke de Boer, Dr. med. Konstantin Prass, PD Dr. rer. nat. Frank Kirchhoff und PD Dr. med. Ingo Bechmann danke ich für alle fachliche und logistische Unterstützung beim Erlernen der verwendeten Methoden und bei der Durchführung meiner Experimente. Dr. med. Ilker Eyüepoglu hat die organotypischen entorhinal-hippocampalen Hirnschnitte präpariert und mir für die Kokulturrexperimente zur Verfügung gestellt. Dr. med. Konstantin Prass führte den Eingriff der transienten fokalen cerebralen Ischämie durch, dem einige Versuchstiere unterzogen wurden. Ich danke der „Laborfamilie“ der Abteilung für experimentelle Neurologie für die herzliche Aufnahme, die produktive Arbeitsatmosphäre und das gute Miteinander. Nicht zuletzt danke ich meiner Frau Annika für die Geduld und Unterstützung, mit der sie während und nach der Zeit in Berlin die Entstehung meiner Doktorarbeit begleitet hat.